

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE OBSTETRICIA Y GINECOLOGÍA



**RELACIÓN ENTRE LOS BIOMARCADORES DEL CÁNCER DE MAMA
CON LA CARGA TUMORAL OSNA DEL GANGLIO CENTINELA.**

DOCTORANDA:

MARIANA PANAL CUSATI

DIRECTORES:

DRA. MARÍA HERRERA DE LA MUELA

DR. DAVID HARDISSON HERNÁEZ

MADRID 2017.

Agradecimientos

La culminación de este proyecto no sería posible sin la ayuda de cada una de las personas que me han acompañado estos años.

A los directores que me han incentivado y permitido terminar este proyecto. En especial agradecer a la Dra. María Herrera quien ha dedicado infinidad de horas a resolver mis dudas y cavilaciones, sin su ayuda de inicio a fin, este proyecto no hubiera sido posible.

Gracias al Dr. Javier de Santiago, a quien tengo especial admiración, su impulso y apoyo han sido fundamentales en este trabajo.

Agradecer a mi familia y a Javi por la paciencia que han tenido conmigo en los momentos difíciles y por las horas que no hemos podido compartir.

Muchas gracias a todos.

Índice

Resumen.....	5
Abreviaturas	7
Introducción	10
1. Impacto Global del Cáncer de Mama	10
2. Avances en el Conocimiento de la Enfermedad	16
3. Factores pronósticos y predictivos del Cáncer de Mama	17
3.1. Factores Clínicos.	18
3.2. Factores Radiológicos.	23
1.3.3. Factores Histológicos.....	25
1.3.4. Factores Moleculares.	30
1.4. Estadificación Axilar del Cáncer de Mama	35
1.4.1. Biopsia Selectiva del Ganglio Centinela.....	37
1.4.2. Análisis del Ganglio Centinela.	39
1.5. Método OSNA para el análisis del GC	41
Justificación	46
Objetivos Principales	48
Hipótesis.....	49
Pacientes y método.....	50
1. Diseño epidemiológico y población	50
1.2 Criterios de inclusión	50
1.3. Criterios de exclusión.....	50
3. Variables independientes y dependientes	51
3.1. Variables independientes	51
3.1.1. Variables clínicas	52
3.1.2. Variables radiológicas.	53
3.1.3. Variables histológicas.....	54
3.1. 4. Variables moleculares.	55
3.2. Variables dependientes: carga tumoral OSNA.	56
3.2.1. Carga tumoral del ganglio principal.	57
3.2.2. Carga Tumoral total.....	57

3.2.3. Distribución de la carga tumoral.	57
4. <i>Protocolo para la realización de la Biopsia Selectiva Ganglio Centinela</i>	58
5. <i>Método OSNA para el análisis del ganglio centinela</i>	61
6. <i>Análisis estadístico</i>	61
Resultados.....	63
1. <i>Estudio descriptivo</i>	63
1.1. <i>Estudio descriptivo de las variables independientes.</i>	63
1.1.1. <i>Estudio descriptivo de las variables clínicas</i>	63
1.1.2. <i>Estudio descriptivo de las variables radiológicas</i>	65
1.1.3. <i>Estudio descriptivo de las variables histológicas.</i>	66
1.1.4. <i>Estudio descriptivo de las variables moleculares.</i>	69
1.2. <i>Estudio descriptivo de la Carga tumoral OSNA.</i>	71
1.2.1. <i>Estudio descriptivo de la carga tumoral del ganglio principal.</i>	71
1.2.2. <i>Estudio descriptivo carga tumoral total</i>	74
1.2.3. <i>Estudio descriptivo distribución de la carga tumoral.</i>	76
2. <i>Estudio Univariante</i>	78
2.1. <i>Análisis entre las variables clínicas y carga tumoral OSNA.</i>	78
2.2. <i>Análisis entre las variables radiológicas y carga tumoral OSNA.</i>	88
2.3. <i>Análisis de las variables histológicas y la carga tumoral OSNA.</i>	104
2.4. <i>Análisis de las variables moleculares y la carga tumoral OSNA</i>	141
3. <i>Estudio multivariante</i>	141
Discusión	143
1. <i>En relación a el estudio descriptivo</i>	143
2. <i>En relación al estudio univariante.</i>	151
3. <i>En relación al estudio multivariante</i>	161
Conclusiones	162
Bibliografía	164
Anexos	180

Resumen

Introducción: Actualmente entendemos el cáncer de mama como una enfermedad heterogénea, con múltiples fenotipos tumorales, este conocimiento a nivel molecular sobre la enfermedad se encuentra en constante evolución y así como también las posibilidades terapéuticas. Para lograr un tratamiento más individualizado, los factores pronósticos y predictivos en el cáncer de mama cada día cobran mayor importancia. Entre esos factores uno de los más importantes, es la afectación tumoral de los ganglios axilares. El estudio de la afectación axilar, se lleva a cabo mediante la Biopsia Selectiva del Ganglio Centinela (BSGC). La tendencia actual es estadificar la axila a través del resultado BSGC, sin llegar a realizar la linfadenectomía axilar, aun con un ganglio centinela positivo. Este enfoque ha ocasionado un mayor interés en la información que nos puede dar el análisis del ganglio centinela. El método OSNA realiza un análisis de todo el ganglio centinela, a diferencia de otros métodos, los resultados del OSNA se expresan en número de copias de ARN mensajero de CK19, esa cifra de ARNm de CK19, que se le ha determinado como Carga tumoral OSNA, infiere de manera cuantitativa la invasión ganglionar por células tumorales.

Objetivos: Analizar la distribución de la variable carga tumoral (número de copias de ARNm de CK19) del ganglio centinela en el cáncer de mama cuantificada mediante el método OSNA y su relación entre carga tumoral en el ganglio centinela y las características clínicas, histológicas, radiológicas y moleculares inidentificadas como factores predictivos y pronósticos del cáncer de mama.

Pacientes y Método: Se trata de un estudio retrospectivo de tipo descriptivo transversal, de 410 pacientes, que fueron atendidas en la Unidad de Patología Mamaria de Hospital Universitario La Paz, por el servicio de Ginecología. Se incluyeron mujeres con Cáncer

de mama, candidatas a tratamiento quirúrgico primario, a quienes se les realizó BSGC y se analizó con el método OSNA. Las Variables independientes se clasificaron en características: clínicas, radiológicas, histológicas y moleculares del cáncer de mama. Mientras que las variables dependientes de la carga tumoral OSNA se clasificaron en las variables: carga tumoral del ganglio principal, carga tumoral total y distribución de la carga tumoral.

Resultados: se ha observado que para el análisis de la Carga Osna es necesario utilizar la variable con logaritmo Neperiano o estableciendo puntos de cortes determinados. En la variable carga tumoral del ganglio principal se ha utilizado el ganglio centinela que tuviera el mayor número de copias de mANR de CK19. En la variable carga tumoral total se realizó una sumatoria de la carga OSNA de cada uno de los ganglios centinelas. Mientras para estudiar la distribución de la carga tumoral se calculó una carga tumoral promedio y la frecuencia de ganglios que se considerarían positivos, utilizando diferentes puntos de corte de carga OSNA. En cuanto al estudio univariante, fueron las Características Histológicas (tamaño, estadio pT, número de focos tumorales, grado histológico, tipo histológico, infiltración de piel e ILV) con las que la carga tumoral OSNA mostró mayor relación. Mientras que con las Características Moleculares no se encontró ninguna relación. En el estudio Multivariante se encontró asociación independiente entre el Tamaño tumoral y la infiltración linfovascular con la carga tumoral del ganglio principal y con la carga tumoral total.

Conclusiones: La carga tumoral OSNA presenta gran dispersión y la transformación logarítmica facilita la interpretación de los resultados. De todos los factores estudiados los que se relacionan con el número de copias de ARNm de Ck 19 en el GC) son: edad, estado menopáusico y localización tumoral, tamaño tumoral, presencia de multifocalidad, número de focos tumorales, ILV, invasión de piel, grado de diferenciación y tipo histológico. No se ha encontrado relación entre las características tumorales moleculares y la carga tumoral.

Abstract

Background: currently breast cancer is known as a heterogeneous disease, with multiple phenotypes, this molecular knowledge about this disease is constantly evolving as well as the therapeutic possibilities. To achieve a more individualized treatment, is required the study of prognostic and predictive factors. Among these factors, one of the most important is the metastasis of the axillary nodes. The axillary staging is performed by the sentinel lymph node biopsy. Currently is important to predict when is safe to avoid performing axillary lymphadenectomy, even with a positive sentinel node. This approach has led to a greater interest in the information that can give us the analysis of the sentinel node. The molecular technique called OSNA method performs an analysis of the entire sentinel node, unlike other methods, and the results are expressed in copies of mRNA of CK19, that number of mRNA of CK19, which has been determined as total tumor load, quantitatively infers lymph node tumoral invasion.

Objectives: To analyze the distribution of the tumor burden (number of copies of CK19 mRNA) of the sentinel node using OSNA and its relation with clinical, histological, radiological and molecular tumor characteristics, which have been identified as predictive and prognostic factors of breast cancer.

Methods: This is a retrospective cross-sectional descriptive study of 410 patients, who were treated at the Breast Cancer Unit of La Paz University Hospital by the Gynecology Department. We included women with breast cancer, candidates for primary surgical treatment, who were submitted to sentinel lymph node biopsy and analyzed using OSNA technique. The independent variables were classified in Clinical, Radiological, Histological and Molecular Characteristics. While the dependent variables of the OSNA tumoral load were

classified in the variables: tumor load of the main node, total tumor load and distribution of tumor load.

Results: There was shown that for the analysis of the Osna load is necessary to use the variable with Neperian logarithm or with cut-off points. For the tumor load of the main node, it was used the sentinel node with the highest number of mANR copies of CK19. Fort the total tumor load, it was used the sum of the mANR copies of each of the sentinel lymph nodes. In order to study the distribution of tumor load, it was used an average tumor load and the frequency of nodes that would be considered positive, using different OSNA load cut-off points. At the univariate study, it was the histological characteristics with which the OSNA load showed a greater association. Whereas with the molecular characteristics no association was found. With the Multivariate study it was found an independent association between tumor size and lymphovascular infiltration with the tumor load of the main node and total tumor load.

Conclusions: OSNA tumor load showed great dispersion and the logarithmic transformation facilitates the interpretation of the results. Of all the factors studied, those related to the number of copies of Ck 19 mRNAs in the sentinel node were: age, menopausal status, tumor location, tumor size, multifocality, number of tumor foci, ILV, skin invasion , and histological type and grade. No relationship was found between molecular tumor characteristics and tumoral load

Abreviaturas

- AP: Anatomía Patológica
- ARNm: ácido ribonucleico mensajero
- BAG: biopsia por aguja gruesa
- BSGC: biopsia selectiva del ganglio centinela
- CK19: Citoqueratina 19
- CTA: células tumorales aisladas
- EUCAN: European Cancer Observatory
- GC: Ganglio centinela
- HULP: Hospital Universitario La Paz
- ID: Intraductal
- ILV: invasión linfovascular
- MG: Mamoglobina
- Mt: metástasis
- N°GC + número de ganglios centinelapositivos
- OSNA One Step Nucleic-acid Amplification
- PAAF: punción aspiración con aguja fina
- PCR: reacción en cadena de la polimerasa
- RNM: Resonancia Magnética
- RT-LAMP: reverse transcription loop-mediated isothermal amplification
- TNM: Classification of Malignant Tumours

Introducción

1. Impacto Global del Cáncer de Mama

El cáncer de mama es la neoplasia más común entre las mujeres, tanto en países desarrollados como en países en vías de desarrollo. Tiene una alta prevalencia global, siendo la segunda neoplasia maligna más frecuentemente diagnosticada. Mundialmente se calculó una incidencia de 1,67 millones de nuevos casos en 2012 (Tabla 1). Esa cifra representa el 25% de la incidencia total entre todos los tipos de cáncer. También en 2012 se estimaron 0,5 millones de muertes por cáncer de mama, lo que representa 15% de todas las muertes por cáncer en mujeres (1).

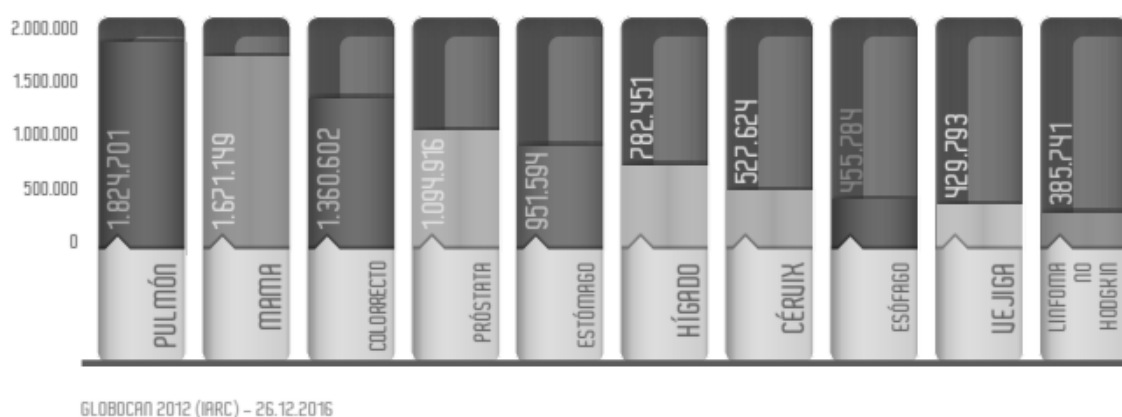


Tabla 1 Incidencia estimada de los tumores más frecuentes a nivel mundial en el año 2012 (ambos sexos). Fuente: Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) Cifras del Cáncer en España 2017.

Afortunadamente, el número de muertes por cáncer de mama, es menos de un tercio de los nuevos casos diagnosticados. Sin embargo, el cáncer de mama es la causa más común de muerte por cáncer en las mujeres en los países menos desarrollados, y la segunda entre las mujeres en los países desarrollados. Por todos estos motivos el cáncer de mama se considera entre los principales problemas de salud pública mundial

(2) (3). Como podemos observar en la Tabla 1, el cáncer de mama fue el segundo tumor en incidencia, a nivel mundial en el año 2012.

En Europa, el cáncer de mama es el más frecuente y el de mayor mortalidad para el sexo femenino. Se estima que para las mujeres de la unión Europea, la posibilidad de desarrollar un cáncer de mama, antes de los 75 años, es del 8% (2). Existen algunas diferencias entre los países Europeos, mientras Bélgica, Dinamarca y Holanda tienen las mayores tasas de incidencia, alrededor de 150 por 100000 casos, otros países como Grecia, Ucrania y Rusia tienen una tasa de incidencia mucho menor, de 60 por 100000 (1). Como podemos observar en las tablas 2 y 3, la incidencia y prevalencia, varía entre algunos países europeos, mientras la mortalidad por cáncer de mama es más o menos similar en todos los países (4) (5).

Tabla 2 Incidencia estimada de los tumores más frecuentes a nivel mundial en el año 2012 (ambos sexos). Fuente: SEOM Cifras del Cáncer en España 2017.

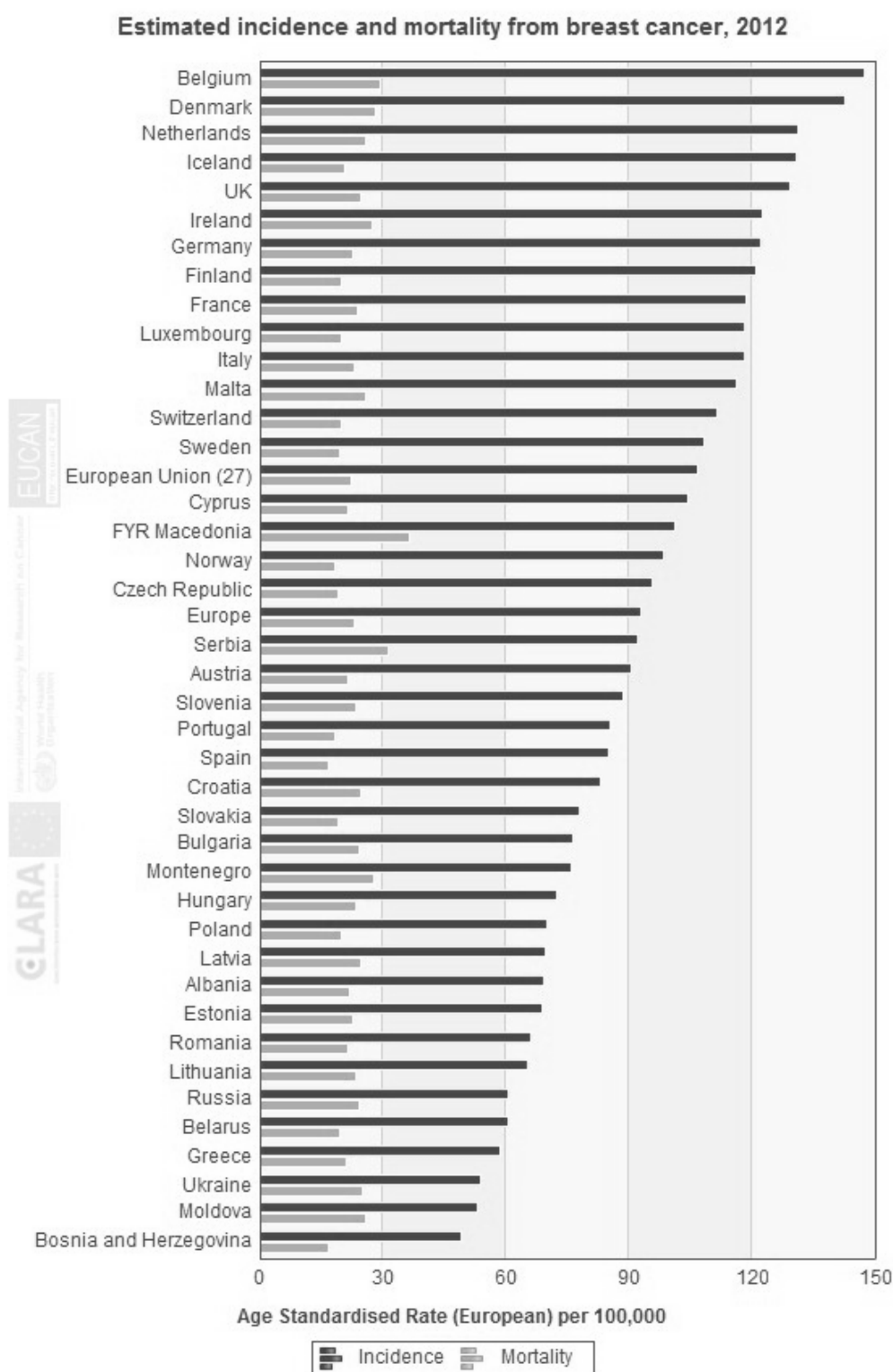
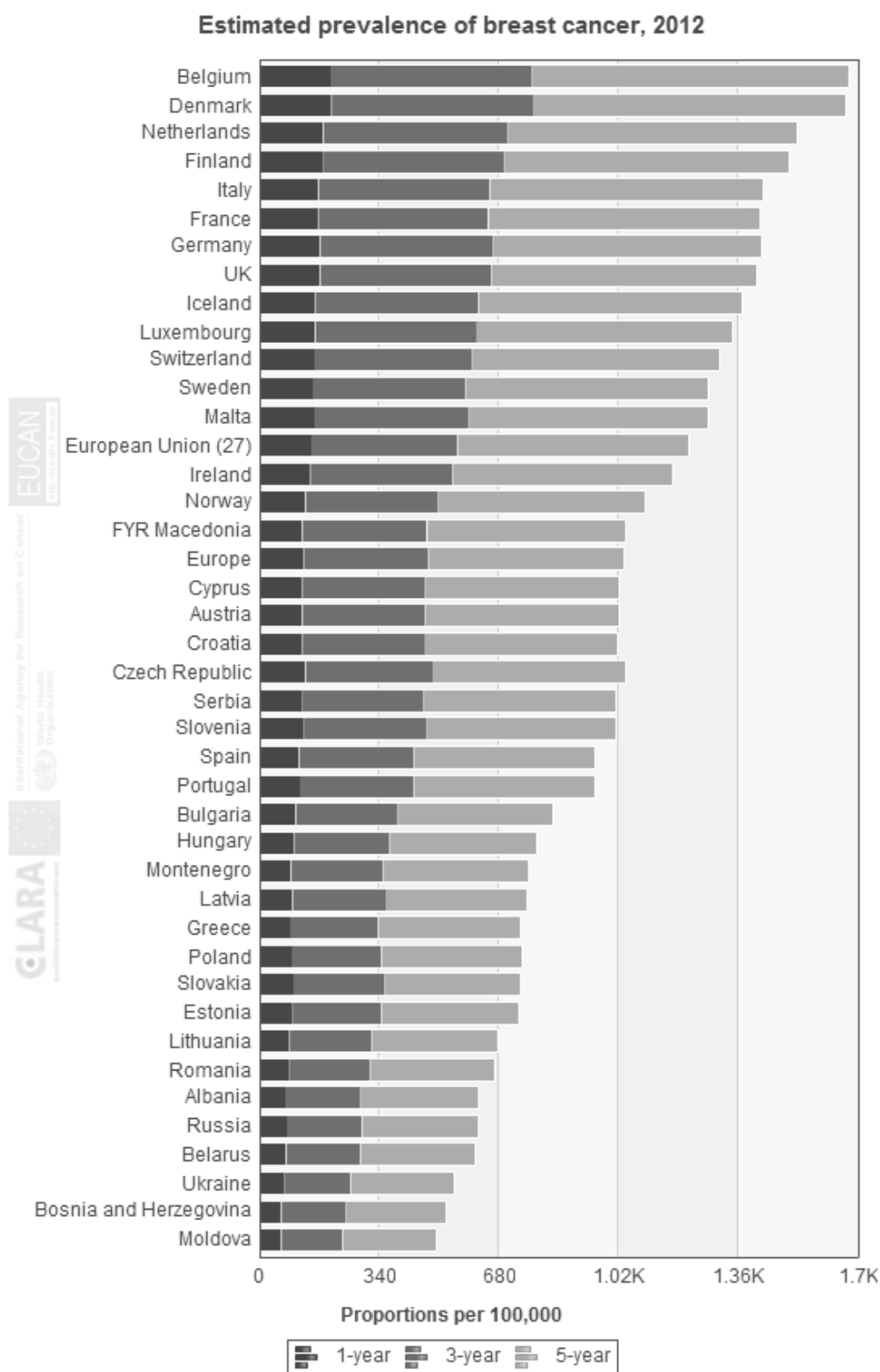


Tabla 3 Prevalencia del Cáncer de mama en Europa durante 2012. Fuente EUCAN – IARC-WHO

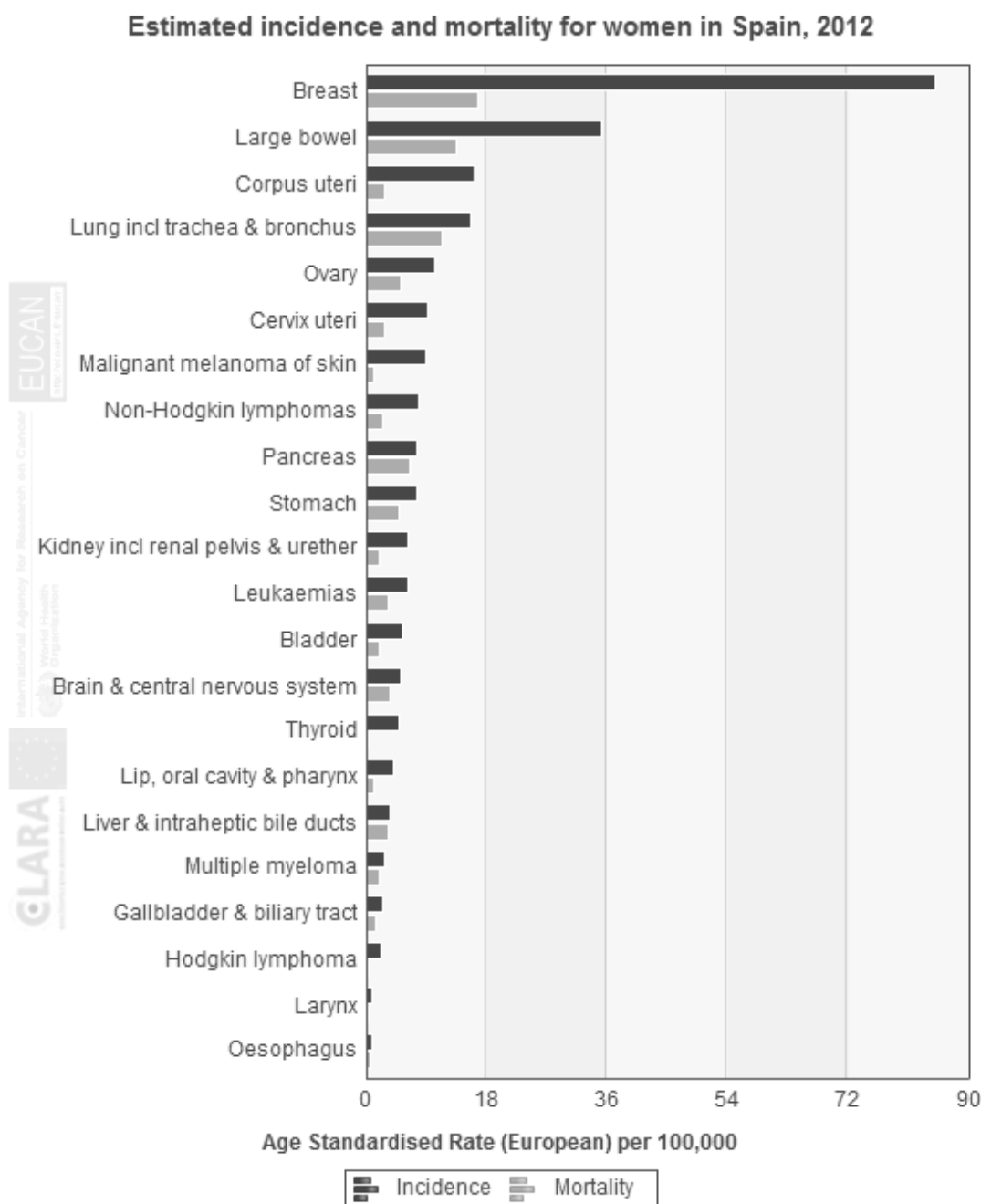


En el año 2015 en España, el número total de nuevos casos de cáncer fue de 247.771 (148.827 en varones y 98.944 en mujeres). Los tipos de cáncer más frecuentemente diagnosticados fueron colon-recto (41.441 casos), próstata (33.370 casos), pulmón (28.347 casos), mama (27.747casos) y vejiga (21.093 casos) (6). La incidencia del cáncer de mama en España se calcula entre las 35-45/100000 habitantes. En las tablas 2 y 3 se puede observar como la incidencia y mortalidad del cáncer de mama supera a la de los demás tipos de cáncer para las mujeres en el año 2012.

En España se diagnostican unos 22.000 nuevos casos al año, lo que representa casi el 30% de todos los tumores del sexo femenino. La mayor incidencia se produce en mujeres entre los 35 y los 80 años, siendo mayor para las mujeres entre los 45 y los 65 años. La incidencia de cáncer de mama en España es baja al compararla con otros países, es menor que la de Estados Unidos y Canadá, Reino Unido, Países Bajos, Bélgica, Alemania, Francia y Suiza. Siendo similar al resto de países de Europa Mediterránea, Centroeuropeos, Portugal e Irlanda. Se estima que la prevalencia total de cáncer en España es de más de 1.500.000 (Tabla 4) (6) (2) (3)

Tabla 4 Incidencia y mortalidad del Cáncer en mujeres en España en el 2012.

Fuente EUCAN – IARC-WHO



2. Avances en el Conocimiento de la Enfermedad

El primer tratamiento para el cáncer de mama consistía en la implementación de una cirugía radical. Una de las técnicas más extendidas fue la mastectomía de Halsted, utilizada desde finales del siglo XIX, que consistía en la mastectomía junto a la extirpación de los músculos pectorales y el vaciamiento ganglionar axilar (7). Estos tratamientos quirúrgicos radicales se basaban en la premisa que el cáncer de mama solamente tenía diseminación por contigüidad. La diseminación a los ganglios era la única considerada en el tratamiento, obviando la vía de diseminación hemática. A pesar de la incorporación al tratamiento de la radioterapia, seguían apareciendo recaídas y metástasis a distancia. Fue entonces cuando comenzó a surgir la idea de la posibilidad de una diseminación vía hemática (8). Hasta finales del siglo XX, la mortalidad global por Cáncer de Mama aumentaba un 2.9% cada año. Desde el inicio de los sistemas de cribado y la implementación de terapias adyuvantes, la mortalidad comenzó a disminuir entre un 20-30%. (9) (2) (5).

El tratamiento adyuvante se implementó como rutina en las pacientes con afectación axilar. Este cambio logró un aumento importante en la supervivencia de las pacientes con cáncer de mama (4). Posteriormente se inició el estudio de las características tumorales y propias del paciente, que permiten ajustar la decisión de extender el uso de terapias adyuvantes y no únicamente en los casos de afectación axilar. El pronóstico de las mujeres con cáncer de mama mejoró drásticamente, lo que permitió ensayos para apoyar cirugías más conservadoras y aumentar la investigación sobre terapias adyuvantes. La cirugía conservadora de la mama comenzó alrededor de 1980, y 15 años más tarde, la biopsia selectiva del ganglio centinela, era aceptada como el procedimiento correcto para realizar la estadificación ganglionar (10).

Con la implantación de sistemas de cribado poblacional en el cáncer de mama y los avances en las pruebas de detección por imagen, la mayoría de los nuevos diagnósticos de cáncer de mama se realiza en tumores en estadios iniciales (11) (12). Es el cáncer de mama en estadios iniciales en el que se encuentran la mayoría de las pacientes y el que genera más controversias en la indicación de quimioterapia, como

tratamiento adyuvante. Para establecer la necesidad de tratamiento adyuvante, actualmente se consideran todos los factores pronósticos y predictivos del cáncer de mama. Entre estos factores se ha encontrado características clínicas, radiológicas, histológicas y moleculares de cada paciente y del tipo de tumor que presentan. El estudio de estos factores pronósticos y predictivos ha permitido que el tratamiento en el cáncer de mama cada vez sea más personalizado, y por lo tanto su estudio, siempre tiene una relevancia científica destacada (13).

3. Factores pronósticos y predictivos del Cáncer de Mama

El estudio de los diferentes factores de riesgo, predictivos o pronósticos, del cáncer de mama, es fundamental para conseguir un tratamiento individualizado. Los factores clínicos, radiológicos, histológicos y moleculares del cáncer de mama, permiten diseñar estrategias de tratamiento adecuadas, de tal forma que no se trate ni en exceso ni deficientemente.

Dentro de estas características tumorales, los factores pronósticos y predictivos que hace más tiempo que se utilizan y por lo tanto se le denominan factores clínico-patológicos clásicos son: el tamaño tumoral, el subtipo histológico, el grado histológico, la afectación ganglionar y la invasión linfovascular (14). Mediante el tamaño tumoral, la afectación ganglionar y las metástasis a distancia, la clasificación TNM (Classification of Malignant Tumours) (15), ha permitido la estadificación del cáncer de forma global y unificada. El objetivo de la TNM es establecer un pronóstico y tratamiento adecuado para cada estadio. Sin embargo aunque la clasificación TNM se sigue empleando para la estadificación del cáncer de mama, a la hora de establecer un pronóstico y ajustar el tratamiento adyuvante no es suficiente (16). A partir de su octava edición, la nueva clasificación TNM, para el cáncer de mama incluye también otras características tumorales. Estas nuevas características incluidas que hasta ahora se venían considerando en la práctica clínica, como la presencia de receptores de estrógeno y progesterona, la presencia del oncogén Her2, el grado histológico tumoral,

y las plataformas genómicas, para el cálculo de riesgo de recurrencia de la enfermedad (17).

3.1. Factores Clínicos.

Entre los factores clínicos asociados al cáncer de mama, los más importantes, o los que confieren mayor riesgo son edad, sexo, factores hormonales y antecedentes familiares. Por su parte, existen múltiples estudios de asociación de factores ambientales y hábitos que conducen a la carcinogénesis. Se han asociado factores de riesgo comunes para cáncer de mama y otros tipos de cáncer, como son la obesidad, el alcoholismo, el consumo de grasas saturadas y la exposición a radiación en la infancia (18) (19) (20).

3.1.1. Antecedentes familiares.

La historia familiar de cáncer de mama sea quizás el factor de riesgo más estudiado. El cáncer de mama, es de dos a tres veces más común en mujeres con antecedentes de cáncer de mama en un familiar de primer grado, el riesgo se multiplica por 15. El riesgo aumenta, si ese familiar fue diagnosticado antes de la menopausia, era bilateral o existen dos o más familiares afectados. Si el familiar con cáncer de mama es la madre, el riesgo para la paciente aumenta 2,3 veces; si se trata de una hermana, 1,8 veces; si se trata de una madre y una hermana afectadas, el riesgo aumenta considerablemente, hasta 14 veces (21). Se han detectado varios genes asociados con el cáncer de mama heredo familiar. Los principales son el BRCA1 y BRCA2. La existencia de un número significativo de familiares afectados de cáncer de mama no asegura la presencia de una mutación genética. De todos los casos de cáncer de mama el 5 por ciento están relacionados con un origen genético. Sin embargo, para las pacientes portadoras de los genes BRCA el riesgo de padecer cáncer de mama a lo largo de su vida es de más del 80% (22) (23). El ser portadora de unos de los genes asociados al cáncer de mama heredo familiar también confiere un tipo de cáncer de mama con ciertas tendencias de comportamiento. Los tumores de pacientes

portadoras de BRCA suelen ser más agresivos, típicamente tumores triple negativos, de alto grado nuclear y de un tamaño avanzado (24).

3.1.2. Cáncer de mama previo.

Las mujeres con antecedentes personales de cáncer de mama in situ o invasivo, tienen mayor posibilidad de desarrollarlo nuevamente. La incidencia de un nuevo cáncer en estas pacientes se ha calculado en aproximadamente un 4% tras los primeros 5 a 7 años del diagnóstico inicial (25). El tipo histológico Ductal Infiltrante o Lobulillar Infiltrante del tumor primario, tienen la misma incidencia para un nuevo cáncer de mama. El cáncer de mama es la neoplasia maligna más común diagnosticada para las pacientes con antecedentes de cáncer de mama (26).

3.1.3. Cirugía de mama.

El cribado con pruebas de imágenes como la mamografía, la ecografía y la resonancia, aporta un considerable número de pacientes que se tendrán que someter a biopsias y extirpaciones de lesiones mamarias. El antecedente de una biopsia quirúrgica en la mama por patología benigna se asocia a un riesgo de 1.5 a 2 de padecer cáncer de mama (27). Además de estos casos, se encuentran el número nada despreciable de mujeres que se someten a cirugía plástica y reparadora de la mama, ya sea por motivos puramente estéticos o para reconstruir después de una cirugía por cáncer de mama. Actualmente se ha reconocido la aparición del Linfoma Anaplásico de Células Grandes en mujeres portadoras de prótesis de silicona, causado por una serie de alteraciones celulares que se producen nivel de la capsula que rodea al implante (28). Existe la hipótesis de que uno de los orígenes de células cancerígenas en la mama podría ser la cicatrización anormal de una herida previa, bien sea causada por traumatismo o cirugía. Así el origen del cáncer, no sólo de mama, podría deberse a la activación de oncogenes, aparición de citoquinas, y reclutamiento de células pluripotenciales, mecanismos presentes durante el proceso de reparación celular (29).

En el modelo de cálculo de riesgo de cáncer de mama: Breast Cancer Risk Assessment Tool (BCRAT), creado por el Doctor Mitchell Gail, incluye el número de biopsias de mama realizadas previamente, entre otros factores como la edad, edad de la menarquía y edad del primer embarazo. Este modelo tiene la intención de calcular el riesgo de cáncer de mama para las pacientes sanas sin antecedentes familiares previos (30).

3.1.4. Patología benigna previa

Las lesiones benignas de la mama se clasifican en proliferativas y no proliferativas, con atipia y sin atipia. Las lesiones no proliferativas son las que no aportan riesgo para patología maligna, mientras que las proliferativas tienen un riesgo asociado del 1.3 al 1.9, tengan o no atipia. Para las lesiones con células atípicas, el riesgo es de 4.1 a 5.3 (31) (32) (33). Las mujeres con tejido mamario de mayor densidad tienen mayor riesgo de padecer cáncer de mama y más dificultades en las técnicas de detección por imagen generando más falsos negativos en el cribado del cáncer de mama que las mujeres con menor densidad mamaria (34).

3.1.5. Edad

La edad es un factor de riesgo y un factor pronóstico de cáncer de mama. El riesgo aumenta con la edad. El 75% de las pacientes que desarrollan cáncer de mama se encuentran por encima de los 50 años. Por otro lado, las pacientes menores de 35 años con cáncer de mama, tienen peor supervivencia y es más común entre ellas presentar la enfermedad en estadios más avanzados o con tumores más agresivos, como los tumores triple negativos. Las mujeres menores de 35 años tienen un porcentaje de supervivencia global a los 5 años de 74.7%, mientras que las pacientes entre 36 a 69 años hasta un 88.3% (19). Algo similar ocurre para las pacientes por encima de 65 años, para quienes se ha estimado que tienen mayor morbilidad por cáncer de mama, debido a la aplicación de tratamientos incompletos o no apropiados,

ya que poseen patologías asociadas y su estado de salud general al diagnóstico es peor, así como un diagnóstico en estadios más avanzados, por encontrarse fuera del cribado poblacional de cáncer de mama (35).

3.1.6. Estado Hormonal

La exposición prolongada a altas concentraciones de estrógenos endógenos, incrementa el riesgo de padecer cáncer de mama. La menarquía precoz parece ser un factor de riesgo, con un riesgo relativo de 1.2 (18). Actualmente, se está registrando una disminución en la edad de la menarquía en países desarrollados, debido al cambio en la dieta, con un mayor importe de grasas y productos alimentarios químicamente alterados (20). La menopausia tardía también es un factor de riesgo. Mientras mayor sea el periodo entre la menarquía y la menopausia, mayor es el riesgo de padecer cáncer de mama (36). Las nulíparas y mujeres con primer embarazo por encima de los 35 años tienen 1.5 veces mayor incidencia de cáncer de mama, al contrario de las mujeres con un embarazo a término antes de los 20 años, que estarían expuestas a la mitad de riesgo (18). Las mujeres que al diagnóstico de cáncer de mama son premenopáusicas, tienen peor pronóstico que aquellas mujeres que al diagnóstico de la enfermedad son menopáusicas. Pero si estas pacientes en estado premenopáusico reciben tratamiento con quimioterapia, y el tratamiento les produce amenorrea, el estado menopáusico adquirido les confiere un mejor pronóstico (37)

3.1.7. Localización del tumor

Algunas series publican que el cáncer en la mama izquierda es un poco más frecuente que en la mama derecha (38). Incluso hay estudios donde encuentran que los tumores ubicados en la mama derecha son de peor pronóstico (39). La correcta localización de la lesión, dentro del tejido mamario, es fundamental para el tratamiento quirúrgico y para la aplicación de la radioterapia. Por este motivo, se ha establecido una nomenclatura para poder ubicar las lesiones en la mama. En la Tabla 5

se muestran las posibles ubicaciones del tumor en la mama y la nomenclatura más frecuentemente utilizada. También existen trabajos en referencia a que la ubicación del tumor en la mama, podría tener un impacto en el pronóstico de la enfermedad (40). Los tumores en cuadrantes internos se han asociado a menor supervivencia (41) y los tumores en CSE con una mejor tasa de supervivencia (40).

Tabla 5 Nomenclatura utilizada para la localización del tumor en la mama.

	Siglas	Ubicación
	UCS	Unión cuadrantes superiores
	UCE	Unión cuadrantes externos
	UCInf	Unión cuadrantes inferiores
	UCInt	Unión cuadrantes internos
	CSE	Cuadrante superior externo
	CIE	cuadrante inferior externo
	CII	cuadrante inferior interno
	CSI	cuadrante superior interno
		Retroareolar

3.1.8 Lesión tumoral Palpable

Cuando el tumor de mama se manifiesta como una lesión palpable, se considera que tiene un crecimiento menos difuso, sin embargo tienen un mayor potencial de producir metástasis y por lo tanto peor pronóstico. La palpabilidad tumoral también se ha relacionado con mayor tamaño tumoral, pero menor extensión de componente Intraductal y de multifocalidad y multicentricidad (42). Las lesiones palpables tienen mayor posibilidad de localizarse correctamente a la hora del tratamiento quirúrgico, y permiten un seguimiento clínico de la respuesta al tratamiento con quimioterapia neoadyuvante.

3.1.9. Cáncer de mama bilateral.

Toda paciente con diagnóstico de cáncer de mama tiene mayor riesgo de presentarlo en la mama contralateral. El cáncer de mama bilateral se puede presentar en el momento del diagnóstico, o en los primeros 6 meses, lo que se denomina cáncer de mama sincrónico. En cambio cuando la bilateralidad se constata después de 6 meses del primer diagnóstico, se denomina cáncer metacrónico. Algunos estudios utilizan 3 meses en lugar de 6 para hacer esta misma clasificación (43). En España se han publicado cifras del 3,8 al 5,8% de casos de cáncer de mama bilateral, de los cuales, un 27% eran sincrónicos y un 73% metacrónicos (44).

3.2. Factores Radiológicos.

Las técnicas de imagen aportan información fundamental para el diagnóstico, tratamiento y seguimiento, de las pacientes con cáncer de mama. Gracias a los avances en las técnicas de imagen, el cáncer de mama se diagnostica en estadios muy precoces. Además la información obtenida por las imágenes cada vez se correlaciona más con los hallazgos anatomopatológicos. Las técnicas de imagen permiten valorar una gran cantidad de características necesarias en el estudio preliminar de una paciente con cáncer de mama, como la existencia de múltiples focos tumorales, la valoración de las cadenas ganglionares y además facilitan la orientación de biopsias de lesiones sospechosas de malignidad. Como herramientas de diagnóstico, las técnicas de imagen, permiten calcular el tamaño histológico aproximado de la lesión, para realizar una estadificación previa al tratamiento y para poder planificar el tipo de cirugía a realizar. También permiten calcular la respuesta de un tratamiento neoadyuvante por la reducción del tamaño de la lesión. La información que nos aportan las técnicas de imagen, cada vez tiene más importancia en el manejo de la paciente con cáncer de

mama. Las características radiológicas facilitan el diagnóstico y la estadificación tumoral, y a la vez tienen un poder pronóstico y predictivo.

3.2.1 Biopsias Radioguiadas.

Gracias a las técnicas de imagen es posible tener un diagnóstico patológico sin necesidad de una biopsia quirúrgica. El uso de la biopsia por aguja gruesa (BAG), y de la punción y aspiración con aguja fina (PAAF), guiadas ambas por técnicas de imagen, se ha convertido en una herramienta indispensable para el diagnóstico de la patología mamaria (45) (33). Además, las técnicas de imagen permiten una valoración clínica de las cadenas ganglionares en las pacientes con cáncer de mama. Cuando se detecta una imagen sospechosa de adenopatía tumoral, se puede obtener material para su análisis a través de una PAAF o BAG. Por lo tanto, estas biopsias hacen posible estadificar la enfermedad sin necesidad de una intervención quirúrgica. Lo que permite planificar la cirugía de una manera más efectiva, o iniciar una terapia neoadyuvante primaria (46).

3.2.2. Número de lesiones o focos tumorales

Cuando existe más de un foco tumoral, se realiza el diagnóstico de cáncer de mama multicéntrico o multifocal. Las lesiones multicéntricas son aquellas que se encuentran ubicadas en diferentes cuadrantes, o separadas por una distancia de 5 cm o más. Las lesiones multifocales se encuentran en el mismo cuadrante o la distancia entre los focos no supera los 5 cm. La planificación del tratamiento y el pronóstico de la paciente cambian, si se diagnostican múltiples imágenes radiológicas sospechosas de malignidad. Los tumores multifocales y los tumores multicéntricos, están relacionados con un peor pronóstico y peor resultado quirúrgico (47). Requiriendo algunas veces múltiples intervenciones para lograr márgenes libres (48).

3.2.3. Tamaño Clínico o Radiológico.

El tamaño estimado por las pruebas de imagen, se le denomina clínico o radiológico y está definido por la medida del mayor diámetro de la lesión. La digitalización de las pruebas de imagen, ha permitido una mejor aproximación del tamaño tumoral real. Entre las técnicas de imagen, se considera la RNM como la mejor para aproximar el tamaño tumoral (49). A la hora de planificar el tratamiento, sea quirúrgico, o neoadyuvante, es necesario conocer el tamaño radiológico. Además el tamaño radiológico permite analizar de manera precoz la respuesta al tratamiento con quimioterapia neoadyuvante.

1.3.3. Factores Histológicos.

3.3.1. Estadío pT.

Dentro de la clasificación TNM (15), el tamaño tumoral es indicado con la T, y se refiere al tamaño medido en milímetros. También, tomando en cuenta el mayor diámetro tumoral. No debe incluir áreas de fibrosis que se encuentren en el tumor. En el caso de tumores multifocales o multicéntricos se utiliza el tamaño del foco mayor. La letra p se asocia cuando el tamaño que se está utilizando para la estadificación, se refiere al medido en la pieza histológica (estadío pT). En el caso de utilizar el tamaño clínico o radiológico de la lesión se utiliza la c (estadío cT). En Tabla 6, podemos ver la clasificación TNM para el tamaño tumoral (15).

Tabla 6 Clasificación TNM para el tamaño tumoral.
Fuente: AJCC Cancer Staging Manual, Seventh Edition (2010) Springer New York, Inc.

TX	Tumor primario desconocido
T0	No evidencia de tumor primario
Tis	Carcinoma in situ
Tis (DCIS)	Carcinoma Ductal in situ
Tis (LCIS)	Carcinoma Lobulillar in situ
Tis (Paget's)	Enfermedad de Paget sin asociación a carcinoma insitu o Intraductal
T1	Tumor ≤20 mm
T1mi	Tumor ≤1 mm
T1a	Tumor >1 mm pero ≤5 mm
T1b	Tumor >5 mm pero ≤10 mm
T1c	Tumor >10 mm pero ≤20 mm
T2	Tumor >20 mm pero ≤50 mm
T3	Tumor >50 mm
T4	Tumor de cualquier tamaño con invasión directa de la pared torácica o de la piel
T4a	Extensión a la pared torácica sin incluir invasión de músculos pectorales
T4b	Ulceración de la piel o nódulos satélites en piel, o piel de naranja.
T4c	Cuando existe tanto T4a como T4b
T4d	Carcinoma inflamatorio

3.3.2. Tamaño total y Tamaño del foco mayor

El tamaño patológico es el tamaño que se obtiene al realizar la extirpación del tumor, tras el análisis patológico de la pieza quirúrgica. El tamaño patológico total es el que se obtiene al sumar el tamaño de todos los focos encontrados del tumor. El tamaño del foco mayor es el que se utiliza para la clasificación del tumor en estadios según la clasificación TNM (15). En el caso del cáncer de mama, el tamaño tumoral, está relacionado inversamente con la supervivencia libre de enfermedad (50). En los tumores sin afectación axilar, el tamaño, es el factor pronóstico más importante. A mayor tamaño tumoral, mayor será la posibilidad de recurrencia (51).

3.3.3. Número de Focos

El número de focos patológicos, es el número de focos tumorales que se encuentran tras el análisis patológico de la pieza quirúrgica. Como hemos mencionado anteriormente, la multifocalidad o multicentricidad, empeora el pronóstico de la paciente (52). Un hallazgo de un foco tumoral no visualizado previamente, puede condicionar la necesidad de una segunda intervención quirúrgica, para ampliar los márgenes de seguridad (53).

3.3.4. Tipo Histológico

La mayoría de los cánceres de mama son una neoplasia del epitelio, y suelen originarse en los conductos de tamaño intermedio, o en conductos y lóbulos terminales. Los dos tipos histológicos más comunes en el cáncer de mama, son el ductal y el lobulillar. La clasificación utilizada internacionalmente para los tipos histológicos, es la publicada por la OMS y la 4ª edición es la más reciente (Tabla 7) (54). El diagnóstico de carcinoma lobulillar y carcinoma ductal se basa más en el aspecto histológico, que en el origen del mismo (55). Se ha calculado una distribución del 75% y 15% de carcinoma ductal y lobulillar, respectivamente, entre todos los casos de carcinoma de mama (56). Algunos estudios muestran que esta relación puede cambiar con el tiempo, ya que se está observando un crecimiento en la incidencia del carcinoma lobulillar. Al parecer, este repunte de incidencia está relacionado con el uso de terapia hormonal sustitutiva que combina estrógenos y progesterona (57). El carcinoma lobulillar infiltrante, suele presentar al diagnóstico, tamaños tumorales mayores, que los ductales. Mientras los lobulillares, los mixtos (ductal/lobulillar) e inflamatorio, suelen asociar mayor afectación ganglionar al diagnóstico. Los tipos, mucinoso, tubular, comedón, y papilar, tienen menor tendencia a la afectación axilar (58).

Tabla 7 OMS Clasificación de los Tumores de Mama. 4ª edición.

Type	Classification
Invasive carcinoma of no special type (NST)	8500/3
Pleomorphic carcinoma	8522/3
Carcinoma with osteoclast-like stromal giant cells	8035/3
Carcinoma with choriocarcinomatous features	
Carcinoma with melanotic features	
Invasive lobular carcinoma	8520/3
Classic lobular carcinoma	
Solid lobular carcinoma	
Alveolar lobular carcinoma	
Pleomorphic lobular carcinoma	
Tubulolobular carcinoma	
Mixed lobular carcinoma	
Tubular carcinoma	8211/3
Cribriform carcinoma	8201/3
Mucinous carcinoma	8480/3
Carcinoma with medullary features	
Medullary carcinoma	8510/3
Atypical medullary carcinoma	8513/3
Invasive carcinoma NST with medullary features	8500/3
Carcinoma with apocrine differentiation	
Carcinoma with signet-ring-cell differentiation	
Invasive micropapillary carcinoma	8507/3
Metaplastic carcinoma of no special type	8575/3
Low-grade adenosquamous carcinoma	8570/3
Fibromatosis-like metaplastic carcinoma	8572/3
Squamous cell carcinoma	8070/3
Spindle cell carcinoma	8032/3
Metaplastic carcinoma with mesenchymal differentiation	
Chondroid differentiation	8571/3
Osseous differentiation	8571/3
Other types of mesenchymal differentiation	8575/3
Mixed metaplastic carcinoma	8575/3
Myoepithelial carcinoma	8982/3
Epithelial-myoepithelial tumors	
Adenomyoepithelioma with carcinoma	8983/3
Adenoid cystic carcinoma	8200/3
Rare types	
Carcinoma with neuroendocrine features	
Neuroendocrine tumor, well-differentiated	8246/3
Neuroendocrine carcinoma poorly differentiated (small cell carcinoma)	8041/3
Carcinoma with neuroendocrine differentiation	8574/3
Secretory carcinoma	8502/3
Invasive papillary carcinoma	8503/3
Acinic cell carcinoma	8550/3
Mucoepidermoid carcinoma	8430/3
Polymorphous carcinoma	8525/3
Oncocytic carcinoma	8290/3
Lipid-rich carcinoma	8314/3
Glycogen-rich clear cell carcinoma	8315/3
Sebaceous carcinoma	8410/3

3.3.5 Componente Intraductal

El carcinoma insitu o intraductal de mama se define como un conjunto de células malignas que no han invadido la membrana basal. El potencial de invasión de estas células, es variable y de aparición lenta (59). Se denomina componente intraductal a la aparición de carcinoma insitu cercano a carcinoma infiltrante. En la práctica clínica se ha denominado componente Intraductal extenso, cuando existe más del 30% del tamaño total del tumor ocupado por componente intraductal (60). Al parecer, el componente Intraductal no confiere peor pronóstico. Sin embargo, el hallazgo de componente Intraductal, cercano al margen de la pieza quirúrgica, ocasiona en un número nada desdeñable de casos, la necesidad de una nueva cirugía (61).

3.3.6. Grado Histológico

El grado histológico se obtiene aplicando los parámetros de Nottingham con la modificación de Elston-Ellis (62) del sistema de gradación de Scarff-Bloom-Richardson. Para hacer la clasificación se evalúa: el porcentaje de formación tubular para valorar la apariencia general del tumor, las áreas de mayor atipia o pleomorfismo nuclear y las células que proliferan a través del índice mitótico (62). Globalmente, el grado histológico estima la diferenciación que tienen las células tumorales. El grado histológico 1 son las células bien diferenciadas. El grado 2 células moderadamente diferenciadas y el grado 3 las pobremente diferenciadas. A mayor grado histológico, las células tienen menos diferenciación y por lo tanto peor pronóstico.

3.3.7 Infiltración de piel

Es una característica histológica de mal pronóstico. La infiltración de piel, puede ser microscópica o extensa. Aunque la infiltración de piel que es peor para el pronóstico de la paciente es la extensa, no queda claro la infiltración microscópica de la piel también confiere peor pronóstico (63). Algunos trabajos sugieren, que sin llegar a infiltrar la piel, los tumores que se encuentran más cercanos esta tienen mayor porcentaje de metástasis linfáticas (64) (65). Cuando la infiltración de la piel es extensa, y se producen úlceras o nódulos satélites en piel, se trata de un carcinoma de mama localmente avanzado o T4, ver Tabla 6.

3.3.8 Invasión linfovascular (ILV)

Se basa en la presencia de células tumorales en los vasos linfáticos y sanguíneos, como reflejo de mayor posibilidad de diseminación a distancia (66). La determinación de ILV tiene un gran componente subjetivo y por lo tanto pierde reproducibilidad y fiabilidad. La presencia de ILV, empeora el pronóstico de la paciente con cáncer de mama, especialmente cuando se asocia a otros factores de mal pronóstico (67).

1.3.4. Factores Moleculares.

Los avances en la Biología Molecular, han permitido el descubrimiento de múltiples genes y proteínas asociados al cáncer de mama. En conjunto, estas características moleculares del cáncer de mama son denominadas biomarcadores (14). La investigación sobre nuevos biomarcadores, es incontable, sin embargo, no todos han mantenido su importancia pronóstica en el tiempo. Mientras, otras características moleculares como los Receptores Hormonales y el HER2, se han convertido en herramientas fundamentales para el tratamiento del cáncer de mama.

3.4.1. Receptores de Estrógenos

Los receptores hormonales son los biomarcadores mas establecidos y su uso es rutinario en la práctica clínica. En general, la presencia de receptores hormonales se considera un factor de pronóstico favorable. La presencia de Receptores de Estrógeno (RE), es considerado un factor tanto pronóstico como predictivo. Como factor predictivo, su nivel de expresión se correlaciona con la respuesta al tratamiento con terapia hormonal. Las terapias hormonales o endocrinas fueron diseñadas para actuar directamente sobre este receptor, reduciendo la tasa de mortalidad anual un 31% en tumores con RE positivos (68) (69).

3.4.3. Receptores de Progesterona

La expresión del RP está ligada al receptor de estrógeno. Los tumores que expresan receptor de progesterona en ausencia de receptor de estrógeno son raros, representan menos del 1% de los tumores de mama. Está demostrado que, en los tumores que no expresan receptores hormonales, la terapia hormonal no aporta ningún beneficio (70). Sin embargo, en el pequeño grupo de tumores que no expresan RE, pero expresan receptor de progesterona, la terapia hormonal puede tener algún beneficio. La presencia de altos niveles de expresión de RP confiere una mejor respuesta al tratamiento hormonal (71).

3.4.5 Her2

El oncogén HER2, también llamado HER2-neu o c-erb B2, es un gen localizado en el cromosoma 17q12, que codifica a la proteína p185. La expresión de este oncogén

se encuentra en un 15% de todos los tumores de mama (70). El HER2 es un factor de mal pronóstico, su presencia indica más posibilidades de recaída y una tendencia a una menor supervivencia global (72). Gracias a los nuevos tratamientos diana, como el anticuerpo monoclonal Trastuzumab, se ha convertido también en un factor predictivo, ya que la respuesta a este tratamiento suele ser favorable. Además hay estudios que demuestran que la presencia del HER2, confiere buena respuesta a la quimioterapia con Doxorubicina y Paclitaxel (73) (74).

3.4.6 Ki67

Es una proteína que ha demostrado tener un papel importante en la regulación del ciclo celular, ya que está ausente en las células estacionadas o sin replicación, y alcanza niveles máximos de expresión durante la mitosis. Por lo tanto, es un marcador de proliferación celular. Como factor pronóstico se ha asociado a una disminución de la supervivencia libre de enfermedad (75). Como factor predictivo, altos niveles de Ki67, parecen asociarse a una respuesta mayor a la quimioterapia (76). Actualmente, el uso de Ki67 como factor pronóstico o predictivo, es controvertido. Esto se debe principalmente a una falta de consenso sobre que niveles de Ki67 son considerados de peor pronóstico. También es debido a que la cuantificación de la expresión de Ki67 genera mucha variabilidad de interpretación entre laboratorios y observadores, ya que se realiza de modo semicuantitativo, mediante el conteo de los núcleos tumorales teñidos con la inmunotinción específica para Ki67. Sin embargo, algunas guías clínicas y modelos de predicción, lo incluyen como factor pronóstico (77).

3.4.8. P53

La Proteína 53, esta codificada en el gen p53, que se localiza en el cromosoma 17p13. Su función es clave en la regulación del ciclo celular, durante el momento en que una célula que se encuentra en reposo para iniciar la proliferación celular. El

correcto funcionamiento del Gen p53, permite que la proteína 53 detenga el crecimiento de células anormales. Una expresión de p53 elevada, se asocia a peor pronóstico del cáncer de mama (78). Actualmente, aunque la p53 se sigue determinado de manera rutinaria, su valor en la práctica clínica, cada vez es menor.

3.4.9 Subtipo Molecular

Al principio de este siglo, se describieron los subtipos moleculares del cáncer de mama, en los estudios de Perou (79). Posteriormente fueron confirmados por Sorlie (80). Los subtipos moleculares se basan en la detección de genes llamados intrínsecos, que se encuentran presentes en las células del cáncer de mama. El estudio de la agrupación de estos genes intrínsecos ha creado una nueva clasificación molecular del cáncer de mama. Los subtipos moleculares son: Los Luminales (Luminal like), Los Basales (Basal Like) y el subtipo con sobreexpresión de HER2 (HER2 enriched) (79) (81). Los subtipos moleculares han enfatizado la diferencia existente dentro del Cáncer de Mama y sus diversas presentaciones. Cada uno de estos subtipos moleculares, tiene diferentes características, comportamiento y por lo tanto diferente pronóstico (80). Los tipo Luminales son los considerados de mejor pronóstico, responden muy bien a la terapia hormonal, pero muy poco al tratamiento con quimioterapia.

Dentro de los luminales se ha descrito el Luminal tipo A y el Luminal tipo B. Siendo el tipo A de mejor pronóstico, y los de tipo B, con mayor presencia de HER2 y una ligera mejor respuesta al tratamiento con quimioterapia. Los Basales son aquellos que no expresan, en su mayoría, receptores hormonales ni HER2. Es el subtipo más frecuentemente encontrado en las portadoras del BRCA1. El subtipo con sobreexpresión de HER2 es también de mal pronóstico, y no incluye a todos los tumores con HER2 positivo (81).

Los subtipos moleculares se estudian como una clasificación, que permite añadir, un valor pronóstico y predictivo en el cáncer de mama (82). Con este conocimiento genético del Cáncer de mama, se han creado plataformas genómicas como el MammaPrint y el Oncotype. Son herramientas que ayudan a decidir la

necesidad de tratamiento adyuvante, en los tumores en estadios iniciales (83). Sin embargo, estos test tienen un alto coste, por este motivo se ha ideado una forma de clasificar a los tumores de mama según su fenotipo, utilizando los biomarcadores como marcadores subrogados.

Con la expresión tumoral de RE, RP, Ki67 y HER2 se puede estimar la clasificación en subtipos intrínsecos. El Consenso Internacional de Expertos de St. Gallen, desde el 2013 incluye la clasificación en subtipos moleculares según el nivel de expresión de los biomarcadores (Tabla 8) (84), desde entonces la mayoría de las guías clínicas internacionales, incluyen esta clasificación (85).

Tabla 8 Criterios del Consenso de St. Gallen de 2013 para la clasificación clínica subrogada de los subtipos moleculares

Subtipo Molecular	Definición clínica subrogada
Luminal A	RE + RP + HER2 – Ki67 <14%
Luminal B	HER2 Negativo: RE + HER2 – Ki67 >14% o RP –
	HER2 Positivo: RE + Her2 +
HER2 enriquecido	RE – RP – HER2 +
Basal o Triple negativo	RE – RP – HER2 –

1.4. Estadificación Axilar del Cáncer de Mama

Las zonas de diseminación local en el cáncer de mama, son por orden de frecuencia: los ganglios linfáticos axilares, los ganglios de la cadena mamaria interna y los ganglios supraclaviculares. La región axilar es la zona que recibe la mayor cantidad de drenaje linfático proveniente de la mama (86). Desde hace mucho tiempo, las metástasis en los ganglios axilares, se consideran uno de los factores pronóstico de mayor importancia en el cáncer de mama. Las metástasis axilares tienen influencia sobre la recurrencia y la supervivencia (87). La presencia de metástasis ganglionares, disminuye la supervivencia global entre un 28 a un 40% (88) (89). Cuanto mayor es el número de los ganglios linfáticos afectados por metástasis, mayor será el riesgo de recaída de la enfermedad (90).

En el cáncer de mama, es necesario conocer la estadificación de los ganglios axilares para conocer el pronóstico y poder planificar adecuadamente el tratamiento (10). Clásicamente, el estudio de la afectación ganglionar se realizaba mediante la linfadenectomía axilar (LA), un procedimiento quirúrgico complejo y con considerable morbilidad. En un 70 a 80% de linfadenectomías axilares, realizadas en tumores en estadios iniciales, no se encontraba ningún ganglio con metástasis (91). Este hecho sumado a la creciente realización de cirugías conservadoras de la mama, llevó a la búsqueda de alguna técnica menos invasiva para realizar la estadificación axilar.

El primer estudio publicado de ganglio centinela (GC) apareció en 1977. Publicado por Cabanas (92) habló sobre la identificación de ganglios centinela en la región inguinal, en pacientes con cáncer de pene. Quedaba establecido que existe un drenaje preferencial u ordenado desde el tumor a un determinado ganglio, el ganglio centinela. Por lo tanto no es necesario realizar la linfadenectomía si no se encontraban metástasis en el ganglio centinela (92). En 1992, con el estudio de Morton (93), el concepto de ganglio centinela vuelve a surgir en estudios con melanoma. En 1993, Krag publica el primer trabajo sobre ganglio centinela en cáncer de mama (94). En

1994, Giuliano publica unos de los trabajos de mayor impacto sobre el Ganglio centinela en el Cáncer de Mama (95). A partir de entonces se publican numerosos estudios a favor de este procedimiento. Actualmente asumimos que, conociendo el estatus del GC, podemos predecir la afectación del resto de los ganglios linfáticos del territorio estudiado (10) (93).

La biopsia selectiva del ganglio centinela (BSGC) es el procedimiento actualmente recomendado para la estadificación axilar de aquellas pacientes que al diagnóstico presentan axila clínicamente negativa (96). Se ha calculado que hasta un 70% de pacientes con cáncer de mama, en estadios iniciales, no tendrán afectación de los ganglios linfáticos (97). La linfadenectomía axilar, ha sido reemplazada por la biopsia selectiva del ganglio centinela, para la estadificación axilar del cáncer de mama. El ensayo clínico ALMANAC demostró que la BSGC tiene menor complejidad quirúrgica, menos complicaciones y una menor tasa de secuelas como son el linfedema y los trastornos nerviosos y motores del miembro superior. (98)

Actualmente, la fiabilidad de la técnica ganglio centinela no es un tema de debate, su aceptación es global. Múltiples ensayos clínicos aleatorizados, como el NSABP-32 del año 2010 (89) un meta-análisis con un total de 2807 pacientes, demostraron que la realización de la BSGC era comparable con la linfadenectomía axilar, sin modificar la supervivencia global, ni la supervivencia libre de enfermedad de las pacientes. La técnica tiene una sensibilidad entre el 90 al 99%, la tasa de falsos negativos es de 9,8%, y la recurrencia local en pacientes con BSGC negativa se calcula entre 0.1 hasta 1.5% (99) (100) (89). El riesgo de linfedema de la BSGC es de 7% frente a 25% de la linfadenectomía axilar (101) (102). Los criterios para la realización de la BSGC son: Carcinomas infiltrantes T1, T2 y T3 con axila clínicamente negativa. También se puede realizar en el Carcinoma Intraductal cuando: hay indicación de mastectomía, con un tamaño tumoral mayor de 3cm, una lesión palpable, cuando presenta alto grado histológico o comedoconecrosis. Por su parte, la BSGC está contraindicada cuando hay confirmación patológica de adenopatía tumoral, en el Carcinoma inflamatorio, en radioterapia axilar previa y en carcinoma localmente avanzado (103).

Desde el punto de vista histológico, la afectación del ganglio centinela se ha dividido en varios estratos que tienen correlación pronóstica: macrometástasis, micrometástasis y células tumorales aisladas. Macrometástasis es aquella afectación ganglionar mayor de 2 mm. Si la BSGC resulta positiva para macrometástasis, existe un riesgo del 50% de afectación de otros ganglios, o ganglios no centinela (104).

Micrometástasis es la afectación oculta ganglionar, definida en tamaño como menor de 2mm pero mayor de 0,2 mm. Igualmente se considera afectación axilar y en el TNM (15) se describe como pN1 (mi) (105). La presencia de micrometástasis y la necesidad de LA, es un punto que genera controversias, en muchas guías clínicas las micrometástasis no son indicación para realizar LA. Sin embargo está demostrado que la presencia de micrometástasis, empeora el pronóstico de las pacientes si no reciben tratamientos adyuvantes (105).

Se denomina células tumorales aisladas (CTA), cuando la afectación del ganglio centinela que tiene un tamaño menor de 0,2 mm (105). No es considerado afectación ganglionar como tal, y el estadio TNM (15) es pN0 i+. Se ha descrito que con micrometástasis o células tumorales aisladas en el GC el riesgo de afectación de los ganglios no centinela es del 10-15% (105).

1.4.1. Biopsia Selectiva del Ganglio Centinela.

Para localizar el ganglio centinela, es necesaria la administración de un medio que identifique el primer o los primeros ganglios a los que drenaría el tumor. Este medio identificador, se inyecta en la mama, pasa al sistema linfático y se aloja en los ganglios de manera ordenada, permitiendo su identificación. Los lugares más típicos de inyección de medio de detección en la mama son: dérmica, intratumoral, peritumoral y subareolar (106).

Los primeros medios o marcadores utilizados en la detección del GC fueron los colorantes, que permiten la identificación del GC teñido con el colorante por visión directa (95). Luego se implementaron los colorantes conjuntamente con un

radiotrazador coloide, que funciona por medio de una sonda de detección de radioactividad. Los radiotrazadores además permiten la realización de una prueba de imagen para mejorar la localización de los ganglios centinelas (107).

Los colorantes utilizados son moléculas de pequeño tamaño, que se transportan rápidamente a través del sistema linfático. Su rapidez permite hacer la técnica intraoperatoriamente en su totalidad, aunque también deja una corta ventana de precisión (95). Esto se debe a que el colorante se sigue extendiendo a los ganglios de drenaje secundario. Con el uso de colorantes, se han descrito varias desventajas, como son la permanencia del tinte en la piel, reacciones cutáneas severas como necrosis y también están descritas reacciones anafilácticas (108). Actualmente, los colorantes se utilizan únicamente como parte de una técnica mixta, junto con los radiotrazadores coloides para mejorar la tasa de detección durante el aprendizaje de la técnica.

Diversos estudios han demostrado que, los radiotrazadores coloides son mejores para la detección del ganglio centinela (109). El compuesto más utilizado es el coloide de Tecnecio99. Igualmente, la inyección del coloide se realiza a nivel: intratumoral, peritumoral intradérmico o subareolar. Con una sonda se determina el nivel de captación de radioactividad para guiar la localización del GC. Tiene la ventaja de poder realizar la técnica antes de la cirugía y comprobar la migración del coloide hacia los ganglios, con técnicas de imagen (108).

La linfoganmagrafía, es una gammagrafía planar, que permite conocer y confirmar la migración del radiotrazador a los ganglios centinelas. Así mismo permite una localización anatómica previa de los ganglios que se deben extraer. La realización de estas técnicas de imagen antes de la BSGC permite la localización de los ganglios que captaron el radiotrazador mediante una gammacamara. Este es el método recomendado para comprobar preoperatoriamente la migración correcta del radiotrazador (110). El tener una localización relativa permite acortar el tiempo quirúrgico y predecir la cantidad de ganglios centinela que debemos extirpar (111) (112).

Existen equipos híbridos con una tomografía axial computarizada (TAC) de baja dosis y una gammacámara, que permiten realizar un TAC de baja dosis y una tomografía computarizada por emisión de fotones simples (SPECT) a la vez. Se denominan SPECT-TAC aumentando la sensibilidad y especificidad para la localización prequirúrgica de los ganglios centinela que únicamente con la Linfografía (113).

1.4.2. Análisis del Ganglio Centinela.

La importancia del ganglio centinela en la estadificación del cáncer de mama, ha generado la búsqueda de la estandarización de los métodos de análisis. Para ello es fundamental la reproductibilidad del método y la obtención de una buena sensibilidad. Sin embargo, todavía no existen protocolos establecidos de cómo debe ser el análisis del GC. Actualmente se ha encontrado una variedad muy heterogénea de métodos para el análisis del GC, sobre todo para el análisis intraoperatorio (114). El análisis intraoperatorio del GC ofrece la ventaja que en caso de un ganglio centinela (GC) positivo, se pueda realizar la linfadenectomía axilar en el mismo acto quirúrgico. Con lo que se evita una segunda intervención para la paciente.

1.4.2.1. Análisis del GC mediante métodos Histológicos.

Para el análisis intraoperatorio del GC, se han diseñado diferentes métodos de análisis histopatológico más rápidos como: corte por congelación, impronta citológica, tinción rápida de hematoxilina y eosina, consiguiendo un análisis preliminar rápido con resultado intraoperatorio de sensibilidad aceptable (115) (10) (114). No existe un consenso si un método es preferible a otro, o si deben utilizarse en combinación para mejores resultados. Una encuesta realizada en 240 laboratorios de Europa encontró 123 protocolos diferentes para el análisis intraoperatorio del ganglio centinela (116). Posterior al análisis intraoperatorio es necesario el estudio histopatológico completo diferido. El método clásico o histopatológico del análisis del ganglio centinela es la

inclusión en parafina, la tinción con hematoxilina y eosina, y la realización de múltiples secciones entre 2 y 5 micras (103).

La desventaja principal de estos métodos de diagnóstico rápido, es que se basan en un análisis parcial del ganglio, lo que genera resultados falsos negativos, y por lo tanto la posibilidad de una nueva cirugía, cuando el análisis completo del ganglio se lleva a cabo. La técnica de corte por congelación, tiene una sensibilidad aceptable, con una discordancia con el método definitivo de hasta 17% (117) Se calcula que la sensibilidad de la impronta citológica es de 63% al 78%, pero que si se toman en cuenta solo las macrometástasis esta sensibilidad aumenta hasta 94% (118) (115).

1.4.2.2. Análisis del GC mediante métodos moleculares

Los métodos inmunohistoquímicos o moleculares, se diseñaron con el fin de aumentar la sensibilidad de los métodos histológicos intraoperatorios y de unificar los protocolos de análisis del GC. Estos métodos consisten en la detección de marcadores tumorales específicos del cáncer de mama, en las células de los ganglios linfáticos axilares (119) (120). Entre estos marcadores tenemos la Citoqueratina 19 (CK19) y la Mamoglobina (MG). La CK19 es un marcador epitelial que expresan la gran mayoría de células del cáncer de mama. Mientras que la MG es un marcador de tejido mamario.

La mayoría de estos métodos utilizan la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR). Esta técnica permite generar una gran cantidad de copias de ARN, del marcador estudiado. Mediante la amplificación exponencial de las moléculas de ARN detectado, y con la utilización de la enzima llamada transcriptasa inversa (121). Es una técnica altamente sensible, que puede detectar un número muy bajo de copias de los marcadores moleculares buscados.

La evaluación del GC utilizando métodos con PCR, permiten mayor sensibilidad y especificidad. Además pueden ser automatizados, siendo muy apropiados para el análisis intraoperatorio. La mayor sensibilidad de los métodos moleculares e

inmunohistoquímicos permite la detección e identificación con mayor sensibilidad de las micrometastasis, y células tumorales aisladas (122).

Uno de los métodos inmunohistoquímicos es el Gene-Search Breast Lymph Node. Este método detecta la expresión de la Citoqueratina 19 y de la Mamoglobina. Tiene una sensibilidad del 98.1% para la detección de metástasis en GC de más de 1mm, mientras que para la detección de metástasis de 0.2 mm tiene una sensibilidad del 94.7%. La concordancia con el método histológico es de 90.8% (123). Otro de los métodos moleculares empleados es el OSNA que comentaremos con detalle a continuación.

1.5. Método OSNA para el análisis del GC

El nombre OSNA proviene de las siglas en inglés: One Step Nucleic-acid Amplification, que se traduce como amplificación de ácidos nucleicos en un paso (124). Es un método de reciente aparición para el análisis del ganglio centinela desarrollado por la empresa Sysmex de Japón.

El método OSNA requiere la inclusión de todo el ganglio y su homogenización, en un medio especial que ayuda a la lisis del tejido ganglionar durante su centrifugación. Está basado en un proceso de amplificación de ácidos nucleicos. Utiliza una tecnología llamada RT-LAMP de las siglas en inglés: Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification (124). Esta técnica detecta el nivel de expresión de ARN mensajero del gen que codifica la Citoqueratina 19. La Ck19 es un biomarcador tumoral, que ha demostrado alta fiabilidad respecto a los estudiados hasta ahora, para la detección de metástasis ganglionares, mostrando niveles altos en ganglios metastásicos y niveles muy bajos en ganglios libres de metástasis. La mayoría de los tumores de mama expresan Ck19, solamente entre el 3,5% y 6% de los tumores son CK19 negativos (125) (126).

El análisis de los resultados según el método OSNA, es el proceso que diferencia esta técnica del resto ya que se expresa de forma cuantitativa, en número de copias de

ARN. El proceso de la amplificación de ácidos nucleicos resulta en un precipitado que se compara con tres soluciones estándar, con concentraciones con un número de copias de ARN de CK19 determinadas. Con estudios de validación la comparación entre el método clásico y el OSNA han estandarizado de la siguiente manera los resultados en número de copias de ARN: menos de 100 copias de ARN GC negativo, entre 100 y 250 copias células tumorales aisladas, por encima de 250 copias hasta 5000 copias micrometástasis y por encima de 5000 copias macrometástasis. La diferencia con el resto de métodos para el análisis del GC, es que con el OSNA podemos cuantificar con una variable numérica semicuantitativa la afectación del GC (124) (127).

Los estudios de validación del método OSNA, han establecido un índice de concordancia del 93,8-96,5% con el método tradicional, una sensibilidad del 83,3-95,6% y una especificidad del 94,8-96,7% y un Valor predictivo Negativo del 97,6% (128) (129) (130) (131) (132) (133). Posee, pues, mayor sensibilidad que el método clásico y su sensibilidad aumenta en la detección de micrometástasis (127) (134) (135) (135) (136). El método OSNA, a diferencia de los otros métodos moleculares, está teniendo mayor aceptación a nivel mundial, y en España está siendo utilizado en más de 50 hospitales. Aún así, todavía es una técnica en estudio y de la que todavía se puede acumular más evidencia para aumentar su utilidad en la estadificación axilar del cáncer de mama.

1.5.1. Ventajas y desventajas del método OSNA

Como ventajas el OSNA aporta una mayor sensibilidad que los otros métodos de análisis intraoperatorio del GC. Disminuye la sobrecarga laboral del patólogo, dado que no precisa de su presencia en todo el proceso. Elimina la variabilidad interobservador, logrando mejor estandarización de los resultados. Permite el análisis completo del ganglio, obteniendo resultado intraoperatorio definitivo. Se puede realizar el análisis en paralelo de hasta 4 GC.

Como desventajas, el tiempo necesario es mayor que alguno de los métodos rápidos histopatológicos. La instauración de este método conlleva un gasto adicional, por el coste de la maquinaria y los reactivos. Se pierde el análisis de la invasión extracapsular, aunque se puede realizar un estudio diferido de la grasa peri-ganglionar para compensar esta pérdida.

1.5.2. Nuevas líneas de investigación con el método OSNA.

Posteriormente a la aceptación universal de la técnica del ganglio centinela, la linfadenectomía axilar se realizaba únicamente en aquellas pacientes con BSGC positiva. Por otro lado, cada vez es más frecuente la detección de la enfermedad en estadios tempranos. En este grupo de pacientes con estadios tumorales precoces, se ha encontrado que entre un 50-65% de los casos, el ganglio centinela es el único ganglio afecto (137). Teniendo en cuenta el hecho de que no existe beneficio en extirpar ganglios sin metástasis, hoy en día nos enfrentamos con una cantidad significativa de linfadenectomías axilares, donde los ganglios no centinela extirpados se encuentran libres de enfermedad, generando morbilidad innecesariamente.

La tendencia actual es identificar aquellas pacientes que a pesar de tener un GC afectado, los ganglios no centinela estarán libres de metástasis. El estudio Z011, liderado por Giuliano y publicado por la ACOSOG (137), demostró que en pacientes con menos de tres ganglios centinela positivos, cirugía conservadora y tumores de pequeño tamaño es posible no realizar linfadenectomía. Al no encontrar diferencias en la supervivencia global, ni en la supervivencia libre de enfermedad, comparada con pacientes de las mismas características que se había realizado linfadenectomía axilar.

El Z011 es un ensayo clínico bastante controvertido y, por lo tanto, los criterios para la no realización de LA derivados de sus resultados, no se siguen en todos los centros. La investigación sobre la posibilidad de omitir la realización de LA en caso de BSGC positiva continúa (138) (139) (140). Una vez más, los factores pronósticos y predictivos en el cáncer de mama juegan un papel importante en la toma de

decisiones terapéuticas, definiendo el grupo de pacientes que se puede considerar de bajo riesgo para evitar la LA, y también en la realización de sistemas de predicción de afectación de ganglios no centinelas (141) (142) (143) (144).

Los factores tumorales que se han relacionado más con la detección de metástasis ganglionares son: tipo histológico, Invasión linfovascular, tamaño del tumor, localización del tumor, edad, y multifocalidad. El tamaño de la metástasis ganglionar en el GC así como el número de GC afectos también tiene relación con la afectación de los ganglios no centinelas, mientras mayor sea el número de centinela afectos y mayor sea el diámetro de las metástasis ganglionares existe mayor posibilidad de afectación de ganglios no centinelas (145) (146) (147) (148).

Utilizando toda la información que puede aportar la BSGC y los factores tumorales asociados a mayor incidencia de metástasis ganglionares, surge la llamada ultraestadificación axilar. Sobre esta base se han creado nomogramas, que utilizando el tipo histológico tumoral, la invasión linfovascular, el tamaño tumoral, la edad y el estatus de los receptores hormonales, predicen la probabilidad de tener afectación en el resto de los ganglios axilares cuando el centinela es positivo (149) (144). Este enfoque ha hecho que estudiemos más detenidamente toda la información que nos puede dar el ganglio centinela. Para la ultraestadificación es fundamental el uso y desarrollo de métodos moleculares como el OSNA

El método OSNA es una técnica novedosa y todavía en desarrollo. Los estudios principales sobre OSNA han sido destinados a validar la técnica, correlacionando los resultados de este método con los obtenidos por métodos clásicos del análisis del ganglio centinela. Son necesarios estudios prospectivos a largo plazo para correlacionar la cantidad de afectación molecular del ganglio, es decir, la carga tumoral que se obtienen como una variable numérica, peculiaridad destacable del método OSNA y poder relacionar esta variable con el pronóstico de la enfermedad.

El método OSNA permite obtener una variable cuantitativa que informa sobre el nivel de afectación ganglionar de los ganglios positivos, por lo tanto podemos utilizar ese análisis detallado para tener más información, tanto del GC, como para inferir el estado del resto de los ganglios axilares. Con el resultado cuantitativo del OSNA surge

la idea de la carga tumoral del ganglio centinela. A simple vista podemos suponer que una afectación de GC, cuando hablamos de miles de copias, debe tener un análisis diferente a aquella en la que aparecen millones de copias de CK19 en el GC.

Existen estudios que han utilizado la carga tumoral para su análisis y relación con la ultraestadificación axilar. Estos estudios utilizan la sumatoria de la carga tumoral de cada uno de los ganglios centinelas, obteniendo una carga tumoral total, y utilizando este resultado como un factor predictivo para la afectación del resto de ganglios axilares o los llamados ganglios no centinelas (150) (151) (144). Se trata de estudios, que han comparado factores pronósticos y predictivos clásicos como: tamaño tumoral, grado histológico, receptores hormonales e invasión linfovascular, con la carga tumoral total por el método OSNA, buscando un punto de corte en la carga tumoral total a partir del cual existe más riesgo de afectación de los ganglios no centinelas

A falta de estudios que muestren la relación entre la carga tumoral y la supervivencia de cáncer de mama a largo plazo, es importante conocer la relación existente entre las características tumorales y la carga tumoral por OSNA para de esta forma definir si este dato se comporta también como un factor predictivo y/o pronóstico. Estudios recientes demuestran que la carga tumoral de OSNA, al ser incluida en los nomogramas, obtiene mayor potencia en la detección de metástasis de los ganglios no centinela y por lo tanto puede predecir, de una manera más fiable, que pacientes con BSGC positivo podrían evitar la linfadenectomía axilar (144) (142).

Justificación

Los factores pronósticos y predictivos en el cáncer de mama cada día cobran mayor importancia, entre ellos el más importante es la afectación tumoral de los ganglios axilares. El estudio de la afectación axilar, se lleva a cabo mediante la biopsia selectiva del ganglio centinela. Este enfoque ha hecho que estudiemos más detenidamente toda la información que nos puede dar el ganglio centinela. La investigación sobre el cáncer de mama intenta crear una ultraestadificación del cáncer de mama. Esta ultraestadificación utiliza la información pronóstica que nos brinda el ganglio centinela y los demás biomarcadores utilizados en el cáncer de mama, por ello la importancia del uso y desarrollo de métodos moleculares como el OSNA

En nuestro centro, el Hospital Universitario La Paz, se atiende un gran volumen de pacientes con cáncer de mama, alrededor de 300 pacientes al año, de las cuales aproximadamente un 40% serán candidatas a biopsia selectiva del ganglio centinela y a su análisis mediante el método OSNA.

EL método OSNA es una técnica novedosa que se encuentra todavía en estudio. Los primeros trabajos sobre OSNA han sido destinados a validación de la técnica, correlacionando los resultados de este método con los obtenidos por métodos clásicos del análisis del ganglio centinela. Los estudios más recientes buscan darle un significado a la carga tumoral con la que se expresan los resultados del método OSNA. Una parte los estudios que analizan la carga tumoral han encontrado relación entre esta y la posibilidad de afectación de ganglios no centinelas, mientras otros pretenden establecer nuevos puntos de corte de la carga tumoral para dar un mejor diagnóstico de la afectación axilar.

Es importante recopilar mayor cantidad de evidencia científica sobre la carga tumoral del ganglio centinela, obtenida por el método OSNA. Gracias a este análisis

molecular del ganglio centinela, podemos establecer con mayor exactitud la cantidad de afectación del ganglio.

Lo que se pretende con el presente trabajo es explorar la carga tumoral que nos brinda el método OSNA y los diferentes puntos de corte descritos en otros trabajos, para analizar la correlación entre la carga tumoral y los biomarcadores ya conocidos y estudiados extensamente en el cáncer de mama, cuyo papel en el pronóstico y tratamiento está claramente establecido. El fin último es determinar, si la carga tumoral puede convertirse en un marcador pronóstico y predictivo potente e independiente del resto de los ya conocidos.

Objetivos

1. Analizar la distribución de la variable carga tumoral (número de copias de ARNm de CK19) del ganglio centinela en el cáncer de mama cuantificada mediante el método OSNA.

2. Analizar la relación entre carga tumoral en el ganglio centinela y las características clínicas, histológicas, radiológicas y moleculares inidentificadas como factores predictivos y pronósticos del cáncer de mama.

3. Estudiar y describir las características clínicas, histológicas, radiológicas y moleculares en las pacientes con cáncer de mama en estadios iniciales con indicación de biopsia selectiva del ganglio centinela.

4. Explorar diferentes aproximaciones matemáticas de definición de afectación del ganglio centinela a partir de la carga tumoral del método OSNA

5. Definir qué aproximación matemática se correlaciona mejor con las características clínicas, histológicas, radiológicas y moleculares.

Hipótesis

Existe una relación entre la cuantía de carga tumoral en el ganglio centinela, cuantificada mediante el método OSNA y los factores pronósticos y predictivos conocidos en cáncer de mama. De confirmarse esta relación, la carga tumoral del ganglio centinela podría tener, por si misma, un papel pronóstico y predictivo independiente.

Pacientes y método.

1. Diseño epidemiológico y población

Se trata de un estudio retrospectivo de tipo descriptivo transversal. Con la aprobación del comité de ética de HULP (Anexo 1), se incluyeron todas las pacientes consecutivas, atendidas por el servicio de Ginecología, en la Unidad de Patología Mamaria de Hospital Universitario La Paz. Desde abril del 2010 hasta Febrero de 2014. En total se encontraron 410 pacientes que cumplieron con los siguientes criterios de inclusión.

1.2 Criterios de inclusión

- Pacientes con cáncer de mama en estadios iniciales, que han sido candidatas a cirugía como tratamiento primario.
- Estudio axilar mediante biopsia selectiva del ganglio centinela.
- Análisis del ganglio centinela por método OSNA.

1.3. Criterios de exclusión

- Tratamiento con quimioterapia neoadyuvante.
- Diagnóstico de carcinoma intraductal.
- Estadios avanzados, superiores a T3 cN0 M0 en el momento del diagnóstico.
- Carcinoma de mama múltiple, cuando existe en una mama dos o más focos tumorales de diferentes tipos histológico.

3. Variables independientes y dependientes

Las Variables independientes son las características tumorales que hemos clasificado en: Clínicas, Radiológicas, Histológicas y Moleculares. Las variables dependientes son aquellas que miden o cuantifican la Carga OSNA en el GC, y las hemos dividido en: Carga tumoral del ganglio principal, Carga tumoral total y Distribución de la carga tumoral.

3.1. Variables independientes

En la Tabla 9 podemos ver la clasificación de las variables clínicas, radiológicas, histológicas y moleculares. A continuación describiremos como se obtuvieron los datos para cada una de ellas.

Tabla 9 Clasificación de las Variables independientes utilizadas en el estudio.

1. Variables clínicas	1.1 Edad 1.2. Cáncer de mama previo 1.3. Cirugía previa 1.4 Patología benigna previa 1.5 Antecedentes familiares 1.6 Menopausia 1.7 Lateralidad mama izquierda o derecha 1.8 Localización por Cuadrante 1.9 Lesión Palpable 1.10 Cáncer bilateral
2. Variables radiológicas	2.1 PAAF 2.2 Número de lesiones radiológicas 2.3 Foco Único o múltiple: 2.4 Tamaño radiológico total
3. Variables histológicas	3.1. Estadio pT 3.2. Tamaño histológico total 3.3. Tamaño del foco mayor 3.4. Número de Focos AP 3.5. Tipo histológico 3.6 Componente Intraductal 3.7. Grado histológico 3.8 Infiltración de piel 3.9 ILV
4. Variables moleculares	4.1. Receptores de estrógenos 4.2. Receptores de estrógenos en porcentaje: 4.3. Receptores de progesterona 4.4. Receptores de progesterona en Porcentaje: 4.5 Her2: 4.6 KI67 4.7. P53 4.8 Subtipo molecular.

3.1.1. Variables clínicas

Las variables clínicas se obtuvieron de la historia clínica de las pacientes.

- **Edad:** en años como variable continua
- **Cáncer de mama previo:** antecedente propio de cáncer de mama, sin que sea una recaída o recidiva, también se denomina cáncer bilateral metacrónico.
- **Cirugía Previa:** cuando a la paciente anteriormente le habían practicado algún tipo de cirugía sobre la mama con diagnóstico de cáncer de mama.
- **Patología benigna previa:** antecedente de haber tenido algún tipo de patología mamaria benigna.
- **Antecedentes familiares:** definimos como antecedentes familiares la presencia de cáncer de mama en un familiar de primer grado.
- **Menopausia:** se registró si la paciente se encontraba en menopausia o premenopausia en el momento del diagnóstico de cáncer de mama.
- **Lateralidad:** del tumor en la mama izquierda o en la mama derecha
- **Localización por Cuadrante:** las localizaciones registradas: Unión cuadrantes superiores, Unión cuadrantes externos, Unión cuadrantes inferiores, Unión cuadrantes internos, Cuadrante superior externo, cuadrante inferior externo, cuadrante inferior interno y cuadrante superior interno. Se agruparon en tres grupos: retroareolar, cuadrante superior externo con unión de cuadrantes externos y otros.
- **Lesión Palpable:** si la lesión era palpable al momento del diagnóstico.
- **Cáncer bilateral:** si la paciente tenía al momento del diagnóstico cáncer de mama bilateral sincrónico.

3.1.2. Variables radiológicas.

En las variables radiológicas incluimos todos los datos del tumor que se obtienen a partir de las pruebas de imagen, previo al análisis anatomopatológico. El estudio radiológico del tumor se realizó en el Servicio de radiología de HULP. Las pruebas de imagen utilizadas fueron mamografía, ecografía y RNM con contraste. Se utilizó la ecografía como método de imagen de primera elección para registrar el tamaño tumoral y para la valoración axilar. Si se trataba de un tumor no visible por ecografía se utilizó la medida de la mamografía, y en los casos indicados según nuestro protocolo la RNM. La RNM se realiza cuando los métodos diagnósticos previos realizados (mamografía y/o ecografía) no son concluyentes, o en el caso de tumores multifocales, multicéntricos, o del tipo histológico lobulillar. En los carcinomas tipo lobulillar, aunque la mamografía y la ecografía de mama sean concluyentes, se realiza de rutina una RNM por su tendencia a la multifocalidad. Para la realización de PAAF de ganglios axilares sospechosos de metástasis, se utilizaba la ecografía axilar.

- **PAAF:** si se realizó una PAAF en alguno de los ganglios por tener criterio de sospecha de malignidad. En todas las pacientes incluidas en el estudio, el resultado de la PAAF fue negativo.
- **Número de lesiones radiológicas:** recuento del número de focos tumorales observados en las pruebas de imágenes.
- **Foco único o múltiple:** según las pruebas de imágenes si se trataba de una sola lesión tumoral o foco único, si se observaban 2 o más focos tumorales en un mismo cuadrante y a menos de 5 centímetros del foco primario; se definió como multifocal y si se observaban 2 o más focos tumorales en distintos cuadrantes de la misma mama o a más de 5 centímetros del foco primario se definió como multicéntrico.
- **Tamaño Radiológico Total:** el tamaño en milímetros del de mayor diámetro tumoral, si se trataba de focos únicos. Si se trataba de tumores multifocales se utilizó la sumatoria de todos los focos, en milímetros, de la porción del foco tumoral de mayor diámetro.

3.1.3. Variables histológicas.

Las variables histológicas son las que se obtienen del análisis histológico de la lesión tumoral. Los datos provienen del informe del diagnóstico definitivo de la pieza quirúrgica. El análisis histológico fue realizado por el Servicio de Anatomía Patológica de HULP. Para el análisis se realizaron cortes de 4µm de la pieza y se introdujeron durante 30 minutos a 65°C en estufa para secarlos. La desparafinización y la recuperación antigénica se realizaron en el equipo PTL Link DAKO y la inmunotinción se realizó en un equipo de inmunotinción automática en horizontal (Autostainer Plus, DAKO).

- **Estadio pT:** Utilizando el tamaño tumoral del foco mayor, se clasifican los tamaños tumorales de la siguiente manera: pT1mic =1 mm, pT1a= >1 a <5 mm, pT1b= ≥5 a <10mm, pT1c= ≥10 a <20 mm, pT2= ≥20 a <50 mm, pT3= >50mm, según TNM 7ª edición (15).
- **Tamaño histológico total:** recogido en mm, ya sea del foco tumoral único o cuando se trata de focos múltiples, la sumatoria del tamaño de cada uno de los focos.
- **Tamaño foco mayor:** recogido en milímetros; en el caso de tumores multifocales o multicéntricos se toma en cuenta únicamente el tamaño del foco de mayor tamaño.
- **Número de focos AP:** cantidad de focos tumorales que se registran en el análisis histológico.
- **Tipo histológico:** utilizamos la clasificación carcinoma ductal infiltrante, carcinoma lobulillar infiltrante y otros. En el apartado otros incluimos a todos los demás tipos de carcinoma infiltrante. Para la clasificación en tipo histológico se siguen las recomendaciones de la Organización mundial de la salud (Tabla 7) (54).
- **Componente intraductal:** clasificamos los tumores en aquellos con componente intraductal escaso o nulo y aquellos con un componente intraductal extenso o mayor del 30%.

- **Grado histológico:** tumores bien diferenciados o grado I, tumores moderadamente diferenciados o grado II y tumores pobremente diferenciados o grado III, utilizando la escala de Nottingham.
- **Infiltración de piel:** la presencia o ausencia de infiltración microscópica tumoral en la piel.
- **ILV:** la presencia o ausencia de infiltración linfovascular.

3.1. 4. Variables moleculares.

Para realizar el estudio molecular del tumor, se emplearon los siguientes anticuerpos: para los receptores de estrógenos: el clon EP-1, mouse, prediluido, Dako. Para los receptores de progesterona: clon PgR636, mouse, prediluido, Dako. Para el HER2: HercepTest, Dako. Para Ki67 clon MIB1, prediluido, mouse, Dako. La expresión de los receptores hormonales se valoró como el porcentaje de los núcleos de las células tumorales teñidos en el tumor, desde el 1% se consideraron positivos. La cuantificación de la expresión de Ki67 se realizó de modo semicuantitativo de acuerdo a las recomendaciones internacionalmente aceptadas ("International Ki67 in Breast Cancer Working Group") (152). Se realizó una valoración de Ki67 mediante el conteo de los núcleos tumorales teñidos en la zona evaluada (200 núcleos) sin tener en cuenta la intensidad de la inmunotinción y excluyendo del conteo los núcleos de células estromales y células inflamatorias. El índice de proliferación se estableció como la media de los valores obtenidos en tres zonas diferentes de la preparación (incluyendo las zonas con mayor y menor proliferación).

- **RE:** Receptores de estrógenos positivos o negativos.
- **RE %:** es una variable continua del porcentaje de expresión del receptor de estrógeno.
- **RP:** receptores de progesterona positivos o negativos.
- **RP %:** es una variable continua del porcentaje de expresión del receptor de progesterona.
- **Her2:** presencia o ausencia del oncogén Her2.

- **Ki67:** porcentaje de expresión del Ki67. Punto de corte de expresión del Ki67 menor o mayor al 20%.
- **p53:** presencia o ausencia del marcador del antígeno p53.
- **Subtipo molecular:** Según los criterios del consenso de St. Gallen de 2013 (84), se utilizaron las características moleculares para clasificar los tumores en los diferentes subtipos moleculares, como se puede observar en la Tabla 8 de la introducción.

3.2. Variables dependientes: carga tumoral OSNA.

Por cada paciente se recogieron los siguientes datos de la BSGC: el número de ganglios centinela que extraídos de cada paciente y el número de copias de mANR de CK19 que tenía cada uno de los GC. Posteriormente estos datos se clasificaron según las variables dependientes creadas para este estudio: carga tumoral del ganglio principal, carga tumoral total y distribución de la carga tumoral (Tabla 10), a su vez en estas variables se utilizaron diferentes puntos de corte, que se explicaran a continuación.

Tabla 10 Variables dependientes: carga tumoral OSNA

Carga tumoral OSNA	
Variables dependientes	Carga tumoral del ganglio principal
	Carga Tumoral total
	Distribución de la carga tumoral
	<ul style="list-style-type: none"> • Carga tumoral promedio
	<ul style="list-style-type: none"> • Frecuencia de ganglios positivos

3.2.1. Carga tumoral del ganglio principal.

En las variables de Carga tumoral del ganglio principal tomamos en cuenta sólo el GC con la mayor carga tumoral de cada una de las pacientes. En esta variable además utilizamos varios puntos de corte: 250 copias, 5000 copias y 7700 copias. Los dos primeros puntos de corte se establecieron en el primer trabajo de validación de Tsujimoto (124) y el punto de corte de 7700 copias surgió en el trabajo de Deambrogio (153).

3.2.2. Carga Tumoral total.

Denominamos Carga Tumoral Total al utilizar una sumatoria de la carga OSNA de cada uno de los GC de cada paciente. Utilizamos el punto de corte de 15000 copias que fue establecido en el estudio de Peg (150).

3.2.3. Distribución de la carga tumoral.

Para analizar la distribución de la carga tumoral analizamos la Carga Osna promedio y la Frecuencia de GC positivos. EL promedio de carga OSNA resulta de dividir la carga tumoral total (la sumatoria de carga de todos sus GC) entre el número de ganglios centinela mayor o igual a 250 copias, que tenía cada paciente. Para frecuencia de GC positivos utilizamos los puntos de corte: 250 y 5000 copias y se contabilizaron el número de casos con un ganglio centinela con >250 o >5000 copias y el número de casos con con dos más ganglios centinela con >250 o >5000 copias.

4. Protocolo para la realización de la Biopsia Selectiva Ganglio Centinela.

El día previo a la cirugía, alrededor de 24 horas antes, se realiza de forma ambulatoria, la preparación para la localización de ganglio centinela. Este procedimiento se lleva a cabo en el servicio de Medicina Nuclear de HULP. Se utiliza una solución nanocoloide de Tecnecio^{99m}, como radiotrazador que se inyecta preferiblemente en la región peritumoral. Cuando no es posible se realiza inyección en la región periareolar. Después de una hora, se realiza un Spect-Tac para comprobar la migración hacia los ganglios y orientar su localización. Se realiza un informe del spect-Tac que utiliza de apoyo al cirujano en la localización de los GC, ay que precisa el número de GC y su localización. Además se realiza un dibujo sobre la piel de la paciente con rotulador para orientar la ubicación de los ganglios captantes.

La biopsia selectiva del ganglio centinela se realiza en quirófano bajo anestesia general. Es el primer procedimiento a realizar, seguido de la cirugía de la mama. Se realiza una incisión en la axila cercana al punto señalado en la piel previamente, en la Ilustración 1 se ha visto la marca con rotulador en la axila de la paciente. Para la localización se utiliza la gammasonda, en la Ilustración 2 se puede apreciar como se utiliza la ganmasonda dentro del tejido axilar para la localización del GC y en la Ilustración 3 el monitor de que permite saber el nivel de radiación. Finalmente en la Ilustración 4 se ha visto el GC extraído.



Ilustración 1: Marca con rotulador en piel para orientar ubicación del GC.



Ilustración 2: Utilización de la gammasonda para la localización del GC.



Ilustración 3: Monitor de la gammasonda.



Ilustración 4: Ganglio Centinela.

5. Método OSNA para el análisis del ganglio centinela.

Los GC extraídos se envían al servicio de Anatomía Patológica, donde es procesado de la siguiente manera:

- 1.- Limpieza del ganglio centinela de tejido.
- 2.- Determinación del peso del GC, cuando el ganglio pesa más de 600mg es necesario cortarlo en porciones que se analizan por separado. Se pueden analizar hasta 4 ganglios o secciones de GC a la vez.
- 3.- Análisis de GC, la técnica utilizada es la recomendada por los creadores del método OSNA la compañía Sysmex (Kobe, Japón), descrita por Tsujimoto en 2007 (124).
- 4.- Resultados: es una cifra de copias de ANRM, que se ha denominado Carga OSNA.

6. Análisis estadístico .

El análisis estadístico fue realizado en el Servicio de Bioestadística de HULP, con la ayuda del programa SPSS versión 20.0 desarrollado por IBM (USA). La recogida de datos se hizo mediante una base de datos en este mismo programa. Los datos fueron tratados de forma que se conservara la anonimidad. En el Anexo 2 se encuentra el ejemplo de la tabla de recogida de datos.

La descripción de los datos cuantitativos se realizó mediante media \pm desviación típica, mediana, valores mínimo - máximo, y percentiles. Los datos cualitativos con frecuencias absolutas y porcentajes.

Las comparaciones entre variables cuantitativas continuas se realizaron principalmente mediante ANOVA o el test de la t de Student para grupos independientes. Cuando por estratificación o selección de submuestras se trabajó con

tamaños muestrales menores de 30 individuos, o cuando no se podía verificar normalidad en la distribución de las variables (prueba de Kolmogórov-Smirnov), la significación estadística en este tipo de análisis se obtuvo mediante pruebas no paramétricas, Kruskal-Wallis o U de Mann-Whitney.

El análisis de frecuencias entre variables cualitativas, se realizó mediante la prueba de la χ^2 o el test exacto de Fisher cuando fue necesario (si $N < 20$, o si algún valor en la tabla de valores esperados era menor de 5). Cuando se utilizó la χ^2 se aplicó en todos los casos la corrección de Yates. Cuando una de las variables cualitativas expresaba un gradiente, se utilizó la χ^2 de tendencia lineal.

La correlación entre variables cuantitativas continuas se estudió mediante el coeficiente de correlación de Pearson. Cuando las variables cuantitativas se expresaban en forma discontinua como un ordinal, se utilizó el coeficiente de correlación "R" de Spearman.

El análisis multivariante se realizó mediante modelos de Regresión Logística, con el fin de identificar los factores que definitivamente se asocian de forma independiente con la variable dependiente y la magnitud de su efecto ajustado (mediante odds-ratio y su IC95%). El método utilizado fue un algoritmo por pasos hacia delante ("Forward Stepwise") basado en la mejora de la LR (Likelihood Ratio). La capacidad predictiva de los modelos se evaluó mediante el área bajo la curva ROC y su intervalo de confianza al 95%.

Resultados

1. Estudio descriptivo.

1.1. Estudio descriptivo de las variables independientes.

En las variables Independientes, se han recogido todos los factores que pueden estar relacionadas con las metástasis del GC. Se ha utilizado una clasificación en variables: clínicas, radiológicas, histológicas y moleculares.

1.1.1. Estudio descriptivo de las variables clínicas.

- **Edad:** las pacientes estudiadas mostraron una edad Media $60,2 \pm 12,4$ años, la menor edad registrada fue de 34 años y la mayor de 89 años. El 75% de las pacientes tenían entre 50 y 70 años.
- **Cáncer de mama previo:** el 4,9% de las pacientes tenían antecedentes personales de cáncer de mama o lo que se podría definir como un cáncer de mama metacrónico. La mayoría de las pacientes (95,1%) no tenían antecedentes personales de cáncer de mama.
- **Cirugía previa:** el 4,6% de las pacientes habían tenido una cirugía anteriormente en la mama afecta por cáncer de mama, mientras el 95,4% de pacientes no tenían cirugías previas.
- **Patología benigna previa:** el 6,1% de las pacientes habían sido diagnosticadas anteriormente de una patología mamaria benigna. Mientras que la mayoría de ellas, el 93,9% de las pacientes, no habían tenido patología benigna previa de mama.

- **Antecedentes familiares:** el 12,7% de las pacientes tenían un familiar de 1º grado con cáncer de mama, mientras que la mayoría de pacientes, el 87,3%, no tenían antecedentes familiares relevantes de cáncer de mama
- **Menopausia:** El 66,9% de las pacientes ya se encontraban en un estado hormonal menopáusico, y por lo tanto un 33,1 % de pacientes se encontraban en estado hormonal previo a la menopausia.
- **Lateralidad:** En 40,4% de las pacientes la mama afectada por el cáncer de mama fue la izquierda y en un 59,6% de pacientes fue la derecha.
- **Localización por cuadrante:** el 46,8% de las lesiones tumorales se ubicaban en el cuadrante superior externo y unión de cuadrantes externos. Un 8% de tumores se ubicaban en la región retroareolar.
- **Lesión palpable:** el 52,4% de las pacientes tenían lesiones no palpables, y el 47,6% de las lesiones eran palpables en el momento del diagnóstico.
- **Cáncer bilateral:** en el 1,9 % de las pacientes el cáncer debutó de forma bilateral sincrónica, mientras la gran mayoría de pacientes 98,1 % tenían tumores unilaterales.

Tabla 11 Resumen descriptivo de las Características Clínicas de la población.

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS		
Edad		
Media \pm D.E	60,2 \pm 12,4	
mínimo - máximo	34 - 89	
p 25-75	51 - 69	
Ca. mama previo	N	%
No	391	95,1%
Si	20	4,9%)
Cirugía previa		
No	392	95,4%
Sí	19	4,6%
Patología benigna previa		
No	386	93,9%
Sí	25	6,1%
Antecedentes familiares		
No	358	87,3%
Sí	52	12,7%
Menopausia		
No	136	33,1%
Si	275	66,9 %
Lateralidad		
Izquierda	136	40,4%
Derecha	201	59,6%
Cuadrante		
CSE/UCE	175	46,8%
Retroareolar	30	8%
Otros	169	45,2%
Lesión palpable		
No palpable	216	52,4%
Palpable	196	47,6%
Cáncer bilateral		
No	403	98,1%
Sí	8	1,9%

1.1.2. Estudio descriptivo de las variables radiológicas.

- **PAAF:** Se realizó punción aspiración con aguja fina axilar, guiada por ecografía al 21,4% de pacientes, por presencia de ganglios sospechosos por la palpación clínica o por las características ecográficas.
- **Número de lesiones radiológicas:** Las pacientes mostraron una media de número de lesiones radiológicas de $1,19 \pm 0,57$, siendo el mínimo número de lesiones 1, y el máximo 6.

- **Foco único o múltiple:** El 84,8% de las pacientes presentaron lesiones únicas. Mientras el 15,2% de las pacientes, tenía tumores con focos múltiples, de los cuales un 8,8% de multifocales y un 6,4% de multicéntricos.
- **Tamaño radiológico total:** los tumores de la población estudiada, tuvieron una media de tamaño radiológico de 21,22±14,98 mm. El tamaño mínimo registrado fue de 4 mm y el máximo de 132mm, mientras el percentil 25 y 75 lo ocuparon los tamaños de 12 mm y 25mm respectivamente.

Tabla 12: Resumen descriptivo de las características radiológicas de la población.

CARACTERÍSTICAS RADIOLOGICAS		
PAAF	N %	
No	324	78.6%
Sí	88	21,4%
Nº lesiones radiológicas		
Media ± D.E	1,19 ± 0,565	
mínimo - máximo	1 - 6	
p 25-75	1 - 1	
Foco único o múltiple	N %	
Único	345	84,8%
Multifocal	36	8,8%
Multicéntrico	26	6,4%
Tamaño radiológico total		
Media ± D.E	21,22±14,98	
mínimo - máximo	4 - 132	
p 25-75	12 – 25	

1.1.3. Estudio descriptivo de las variables histológicas.

- **Estadio pT:** Al clasificar a los tumores utilizando TNM, según el tamaño por estadios pT, la mayoría de las lesiones se encontraban en el estadio pT1c (46,9%), seguidas por los estadios: pT1b con un 24,4% de pacientes, y el pT2 con un 18,8% de pacientes. Por último, los estadios menos frecuentes fueron: el pT1a con un 6,1%, el pT3 con un 1,7% y el pT1mic con un 1% de pacientes.

- **Tamaño histológico total:** El tamaño histológico total de la lesión tumoral mostró una media de tamaño de $17,91 \pm 12,54$ mm. Con un tamaño mínimo registrado de 1mm y un tamaño máximo de 182mm.
- **Tamaño del foco mayor:** Se ha encontrado que el tamaño del mayor foco tumoral medido en el análisis de anatomía patológica fue de $16,4 \pm 10,86$ mm. El tamaño mínimo registrado fue de 1 mm y el tamaño máximo de 80mm.
- **Número de Focos AP:** Las pacientes mostraron una media de números de focos histológicos de $1,19 \pm 0,06$ focos. Con un máximo de 6 focos registrados.
- **Tipo histológico:** Agrupando los tipos histológicos de cáncer de mama, la mayoría de los tumores fueron de tipo ductal infiltrante un 83,5%, un 14,3% de tipo Lobulillar infiltrante y un 2,2% de otros tipos histológicos tumorales menos frecuentes.
- **Componente intraductal:** La existencia de un componente intraductal extenso (>30%) se encontró en el 22,8% de los tumores. Mientras que, el 76,19% de tumores tenían un componente intraductal escaso o nulo (<30%).
- **Grado histológico:** El grado II, fue el más común entre la muestra, con un 41,9% de tumores. Entre el grado I y el grado III, se ha observado una distribución bastante uniforme, ya que el grado histológico III, lo presentaron un 30,0% de tumores y el grado I un 28,2% de tumores.
- **Infiltración de piel:** se ha encontrado infiltración microscópica de piel en sólo un 3,2% de la muestra. El 96,8% de tumores restantes no tenían infiltración de piel.
- **ILV:** La infiltración linfovascular se encontró en el 17,4% de los tumores, mientras en el 82,6% no se encontró ILV.

Tabla 13: Resumen descriptivo de las características histológicas de la población.

CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS		
Estadio pT		N %
pt1mic		4 1%
pt1a		25 6,1%
pt1b		100 24,4%
pt1c		192 46,9%
pt2		81 19,8%
pt3		7 1,7%
Tamaño	histológico	
total		
Media \pm D.E		17,91 \pm 12,54
mínimo - máximo		1 - 85
p 25-75		10 - 21
Tamaño foco mayor		
Media \pm D.E		16,4 \pm 10,86
mínimo - máximo		1 - 80
p 25-75		10 - 20
Nº Focos AP		
Media \pm D.E		1,19 \pm 0,604
mínimo - máximo		1 - 6
p 25-75		1 - 1
Tipo Histológico		N %
Ductal		344 83,5%
Lobulillar		59 14,3%
Otros		9 2,2%
Componente ID		
Escaso o nulo		317 76,19%
Extenso		94 22,8%
Grado histológico		
Grado I		109 28,2%
Grado II		162 41,9%
Grado III		116 30,0%
Infiltración de piel		
No		393 96,8%
Sí		13 3,2%
ILV		
No		332 82,6%
Sí		70 17,4%

1.1.4. Estudio descriptivo de las variables moleculares.

- **Receptores de estrógenos:** La mayoría de los tumores, un 87,7%, tenían receptores de estrógenos positivos.
- **Receptores de estrógenos en porcentaje:** Los receptores de estrógenos mostraron una media de expresividad del $95,04 \pm 12,36$ %.
- **Receptores de progesterona:** La mayoría de los tumores tenían receptores de progesterona positivos 77,0%, mientras el 23,0% no mostraron receptores de estrógenos.
- **Receptores de progesterona en porcentaje:** con una media de expresividad del $74,02\% \pm 33,59\%$.
- **Her2:** Únicamente el 7,0% de los tumores eran Her2 positivo, el resto de los tumores, un 93,0%, eran Her2 negativos.
- **Ki67:** La media de expresión tumoral de Ki67 era de $17,05\% \pm 16,2\%$. La mayoría de los tumores, un 65,4%, tenían un porcentaje de expresión de Ki67 menor del 20%. Mientras el 34,6% de los tumores tenían un porcentaje de expresión de Ki67 igual o mayor al 20%.
- **P53:** La mayoría de los tumores fueron P53 Negativos, un 78,0%. Mientras que el 22,0% de los tumores expresaban P53.
- **Subtipo molecular:** El subtipo molecular más común fue el Luminal A, un 52,5%. Seguido por el subtipo Luminal B Her2 negativo, un 30,2%. El Basal Like o triple negativo, un 10,2%. El Luminal B Her2 positivo un 5,1% y el Her2 un 2,0%.

Tabla 14: Resumen descriptivo de las características moleculares de la población.

CARACTERÍSTICAS MOLECULARES		
RE	N %	
Negativo	50	12,3%
Positivo	358	87,7%
RE %		
Media \pm D.E	95,04 \pm 12,36	
mínimo - máximo	5-100	
p 25-75	95 - 100	
RP		
Negativo	94	23,0%
Positivo	314	77,0%
RP %		
Media \pm D.E	74,02 \pm 33,59	
mínimo - máximo	1-100	
p 25-75	50 - 100	
Her2	N %	
Negativo	374	93,0%
Positivo	28	7,0%
KI67		
Media \pm D.E	17,05 \pm 16,2	
mínimo - máximo	1-90	
p 25-75	5 - 23	
<20%	257	65,4%
\geq 20%	136	34,6%
P53	N %	
Negativo	163	78,0%
Positivo	46	22,0%
Subtipo molecular		
Luminal A	207	52,5%
Luminal B Her2 negativo	119	30,2%
Luminal B Her2 positivo	20	5,1%
Her2 positivo	8	2,0%
Basal Like	40	10,2%

1.2. Estudio descriptivo de la Carga tumoral OSNA.

Mediante la técnica de la BSGC se extirparon una media de $1,59 \pm 0,697$ ganglios centinelas, por paciente. El total de ganglios centinela estudiados fue de 653 entre 410 pacientes. Considerando GC positivo cuando tiene >250 copias, la media de ganglios positivos por paciente fue de $0,54 \pm 0,732$ GC. En la Tabla 15 se ha encontrado el total de GC estudiados y su distribución según el número de copias.

Tabla 15: Resumen descriptivo de los ganglios centinela de la población.

Ganglios centinela por paciente.		
GC por paciente		
Media \pm D.E	1,59 \pm 0,697	
mínimo -máximo	1-3	
p 25-75	1-2	
GC > 250 copias (positivos)		
Media \pm D.E	0,54 \pm 0,732	
mínimo - máximo	0 - 3	
p 25 - p75	0 - 1	
Total de GC*	N	%
0 a \leq 100 copias	430	65,84%
\geq 100 a < 250 copias	30	4,59 %
\geq 250 a \leq 5000 copias	100	15,31 %
> 5000 copias	93	14,24 %
Total de ganglios	653	100%

* Total de los GC en toda la población

1.2.1. Estudio descriptivo de la carga tumoral del ganglio principal.

Analizamos cada paciente tomando como referencia el ganglio centinela que tenía el mayor número de copias de mANR de CK19. La Tabla 16 resume todos los datos obtenidos con este análisis. Como podemos observar la media de Carga Tumoral del ganglio principal en toda la población fue de 73851,78 copias, con una D.E de \pm 532600,11 copias. La dispersión y la falta de linealidad mejora con el logaritmo neperiano, en el Gráfico 1 aparece la distribución de carga tumoral del ganglio principal

y en el Gráfico 2 se ha visto como la distribución mejora al aplicar logaritmo neperiano. En cuanto al análisis utilizando diferentes puntos de corte para considerar un GC positivos, con el punto de corte de 250 copias se considerarían pacientes con GC positivo a un 37,4 % de la población. Si diferenciamos entre los GC con micrometástasis (mayor de 250 copias pero menor de 50000) y macrometástasis del (>5000 copias), un 19,9% de pacientes tuvieron micrometástasis del GC principal y las un 17,5% de pacientes tuvieron macrometástasis del GC principal. Con un punto de corte de 7700 copias se considerarían pacientes con GC positivo a un 15,6 % de la población, casi un 2% de diferencia que con el punto de corte de 5000 copias.

Tabla 16 Resumen descriptivo de la carga tumoral del GC principal.

Carga Tumoral del GC principal		
Carga tumoral del GC principal		
Media	73851,78	
D.E	532600,11	
mínimo - máximo	0 – 8400000	
P25-75	0 -1070	
En logaritmo neperiano		
Media	5,66	
D.E	3,00	
mínimo - máximo	0 - 15,94	
P25-75	3,76 - 6,97	
250 copias		
0-250	258	62,6%
>250	154	37,4%
5000 copias		
0-250	258	62,6%
250-5000	82	19,9%
> 5000	72	17,5%
7700 copias		
<7700	347	84,4%
≥7700	64	15,6%

Gráfico 1 Distribución de la Carga Tumoral del ganglio principal

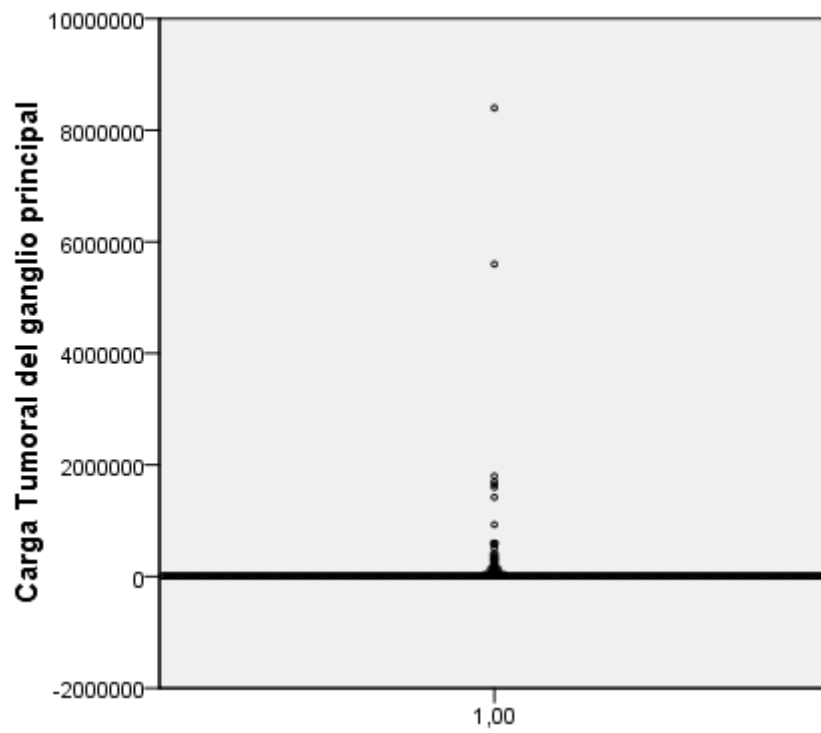
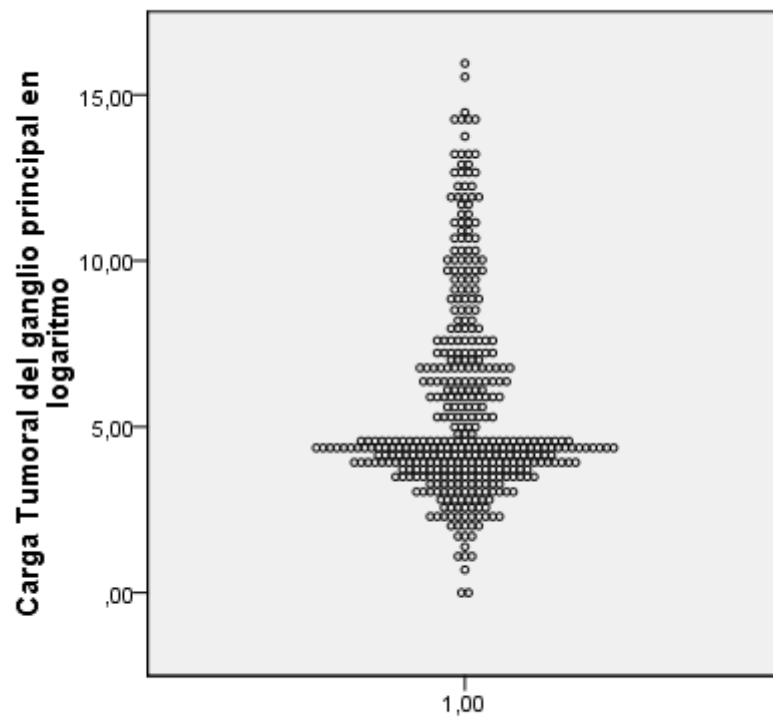


Gráfico 2 Carga Tumoral del ganglio principal en logaritmo



1.2.2. Estudio descriptivo carga tumoral total

Como se ha explicado anteriormente, para la carga tumoral total se utiliza la sumatoria del número de copias de cada uno de los ganglios centinelas. Como se puede observar en la Tabla 17, la media de la carga tumoral total fue de 83697,20 copias, y la desviación estándar de 560636,64 copias, mayor que la media. Es necesario utilizar el logaritmo neperiano para evitar la dispersión y la falta de linealidad de la carga tumoral total. La diferencia se observa mejor gráficamente, en el Gráfico 3 se muestra la carga tumoral total y en el Gráfico 4 como se distribuye utilizando logaritmo neperiano. Al aplicar un punto de corte de 15000 copias a la carga tumoral total un 13,6% de pacientes tuvieron una carga tumoral total mayor de 15000 copias y un 86,4% menor o igual a 15000 copias.

Tabla 17: Carga tumoral total.

Carga Tumoral Total		
Carga tumoral total		
Media	83697,20	
Mediana	0	
D.E	560636,64	
mínimo - máximo	0 - 8400720	
P25-75	0 -1.200	
logaritmo neperiano		
Media	5,67	
Mediana	4,45	
D.E	3,04	
mínimo - máximo	0 - 15,94	
P25-75	3,76 – 7,09	
15000 copias	N	%
≤15000	355	86,4%
>15000	56	13,6%

Gráfico 3: Distribución de la carga tumoral total.

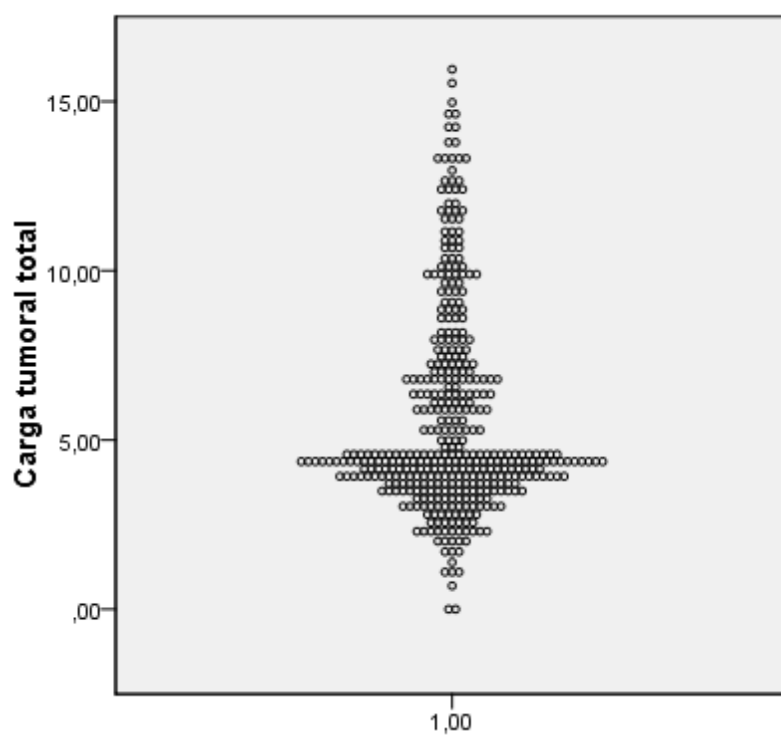
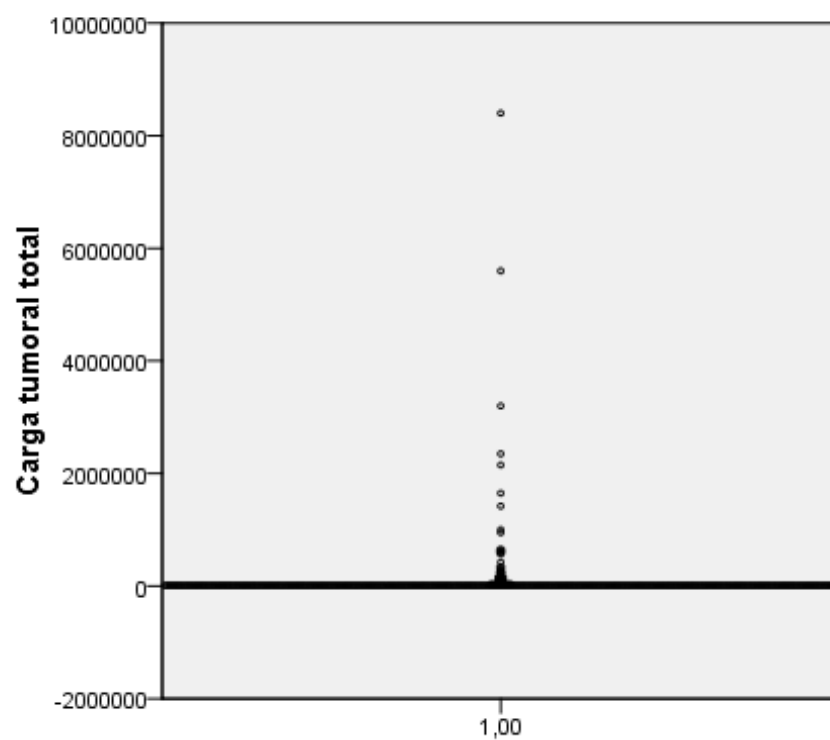


Gráfico 4: Distribución de la carga tumoral total en logaritmo.

1.2.3. Estudio descriptivo distribución de la carga tumoral.

Para analizar la distribución de la carga tumoral se ha realizado un promedio de la carga tumoral total entre el número de ganglios positivos, considerando como positivos todos los GC mayores de 250 copias. Se observó una media de 136169,06 copias con una D.E de $\pm 583601,93$ copias (Tabla 18). Se puede apreciar en el Gráfico 5 y el Gráfico 6, como ocurre en los análisis anteriores, es necesario utilizar logaritmo neperiano para mejorar la distribución de la carga tumoral.

Además para estudiar la distribución de la carga tumoral también se ha realizado un análisis que toma en cuenta la cantidad de ganglios que se considerarían positivos, utilizando diferentes puntos de corte de número de copias de mRNA.

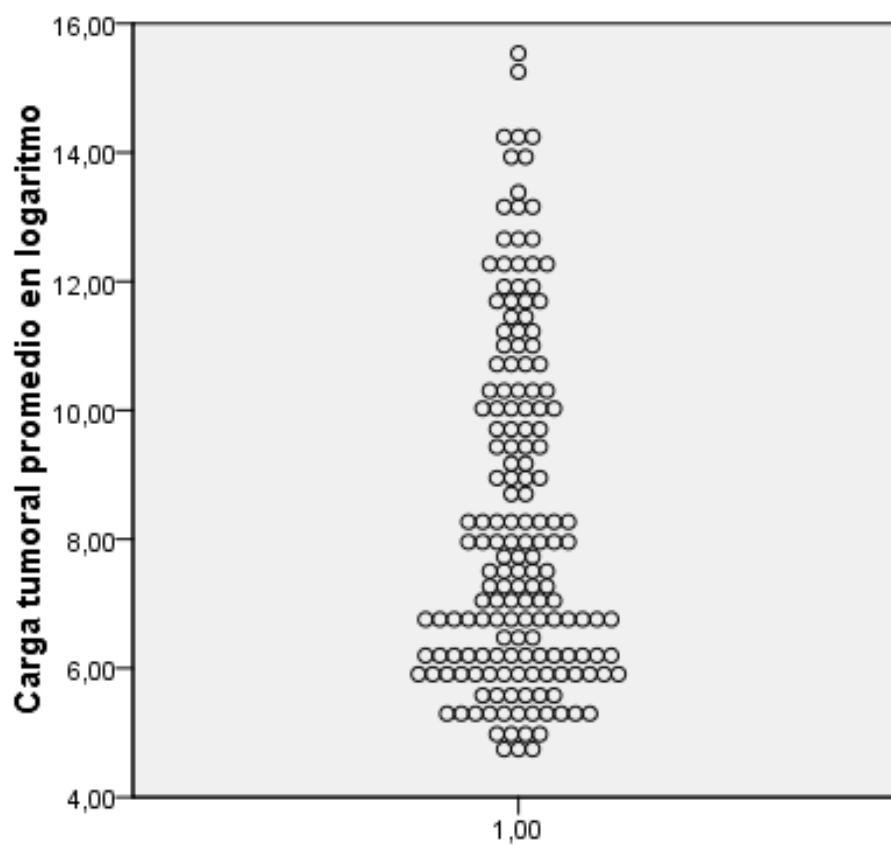
Utilizando un punto corte de 250 copias para GC positivo, un 29,4% de pacientes tenían 1 GC positivo y un 7,8% de pacientes tenían dos o más GC positivos. Estableciendo un punto corte de 5000 copias un 13,3% de pacientes tenían 1 GC positivo y un 4,1% de pacientes tenían dos o más GC positivos.

Tabla 18: Distribución de la carga tumoral.

Distribución de la carga tumoral		
Carga tumoral promedio		
Media	136169,06	
D.E	583601,93	
mínimo - máximo	110 - 560000	
P25-75	470 – 27.067,50	
logaritmo neperiano		
Media	8,31	
D.E	2,62	
mínimo - máximo	4,70 - 15,54	
P25-75	6,15 - 10,21	
Frecuencia de GC positivos		
> 250 copias	N	%
0	259	62,9%
1	121	29,4%
≥2	32	7,8%
>5000 copias		
0	340	82,5%
1	55	13,3%
≥2	17	4,1%

Gráfico 5 Distribución de la carga tumoral promedio.

Gráfico 6 Promedio de carga tumoral en logaritmo neperiano



2. Estudio Univariante.

2.1. Estudio univariante entre las variables clínicas y carga tumoral OSNA.

En el todo el estudio univariante para hacer las correlaciones utilizamos la carga tumoral en logaritmo o con un punto de corte establecido. Las variables clínicas que mostraron relación estadísticamente significativa con la tumoral OSNA: Edad, Menopausia y Lateralidad del tumor. Como se puede observar en la Tabla 19, estas variables se resaltan en negro. A continuación se describirá con detalle las variables donde se ha encontrados asociaciones estadísticamente significativas, que son las que aparecen en los recuadros grises de la Tabla 19.

Tabla 19: Estudio univariante entre las variables clínicas y carga tumoral OSNA.

Carga tumoral OSNA	Variables Clínicas								
	Edad	Ca. previo	Cirru. Previa	Patol. Benig.	Ant. Fam.	Menopausia	Lateralidad	Localización	Ca. bilateral
Carga tumoral del GC principal									
Carga tumoral del GC principal									
250									
5000									
7700									
Carga tumoral total									
Carga tumoral total									
15000									
Distribución de la carga tumoral									
Carga tumoral promedio									
Frecuencia GC positivos									
> 250									
> 5000									

Recuadros Grises: Relación significativa $p < 0,05$

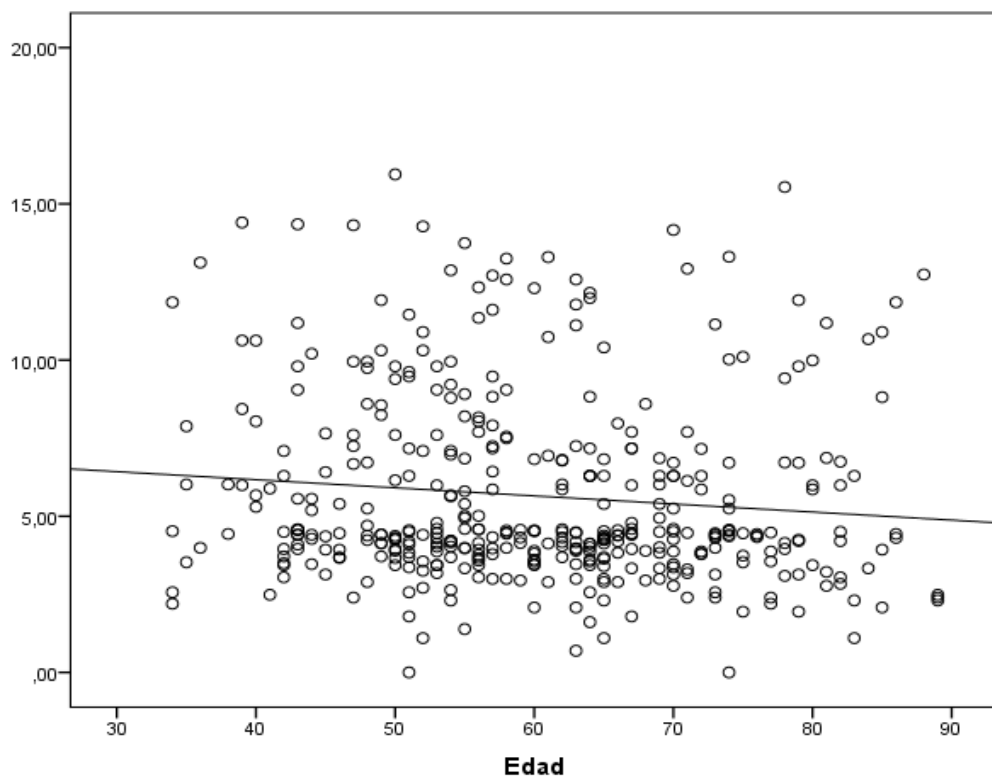
Recuadros Blancos: Relación No significativa

2.1.1. Edad y carga tumoral OSNA.

- Edad y carga tumoral del GC principal.

Se observó una relación inversamente proporcional entre la carga tumoral del GC principal aumentaba y la edad, así las pacientes más jóvenes tienen una tendencia a mayor carga tumoral del GC principal (Gráfico 7), con Índice de correlación de Pearson de $-0,11$ y esta asociación fue estadísticamente significativa ($p0,029$). Con los demás puntos de corte de la carga tumoral del GC principal no se encontraron relaciones estadísticamente significativas.

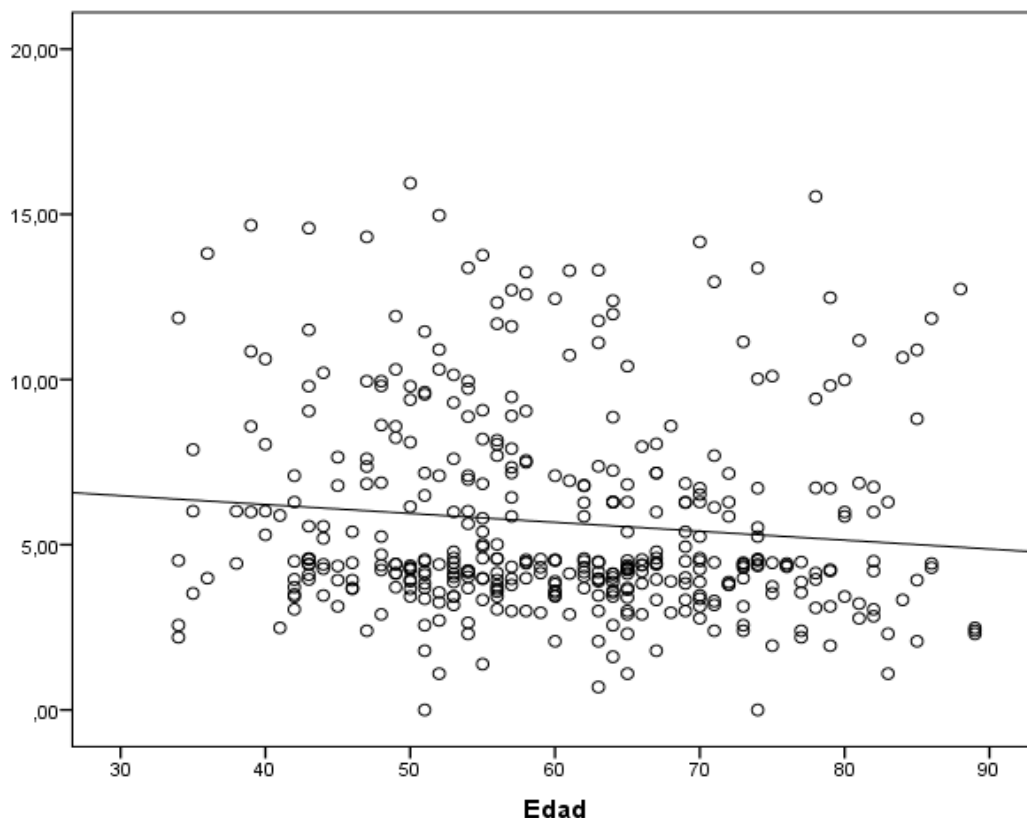
Gráfico 7: Edad y carga tumoral del GC principal ($p0,029$).



- **Edad y carga tumoral total**

Las pacientes de menor edad tenían mayor carga tumoral total (Gráfico 8), con un Índice de correlación de Pearson de -0,11, este resultado fue estadísticamente significativo ($p < 0,025$). No se encontró relación con edad y el punto de corte de 15000 copias de carga tumoral total.

Gráfico 8: Edad y carga tumoral total ($p < 0,025$).

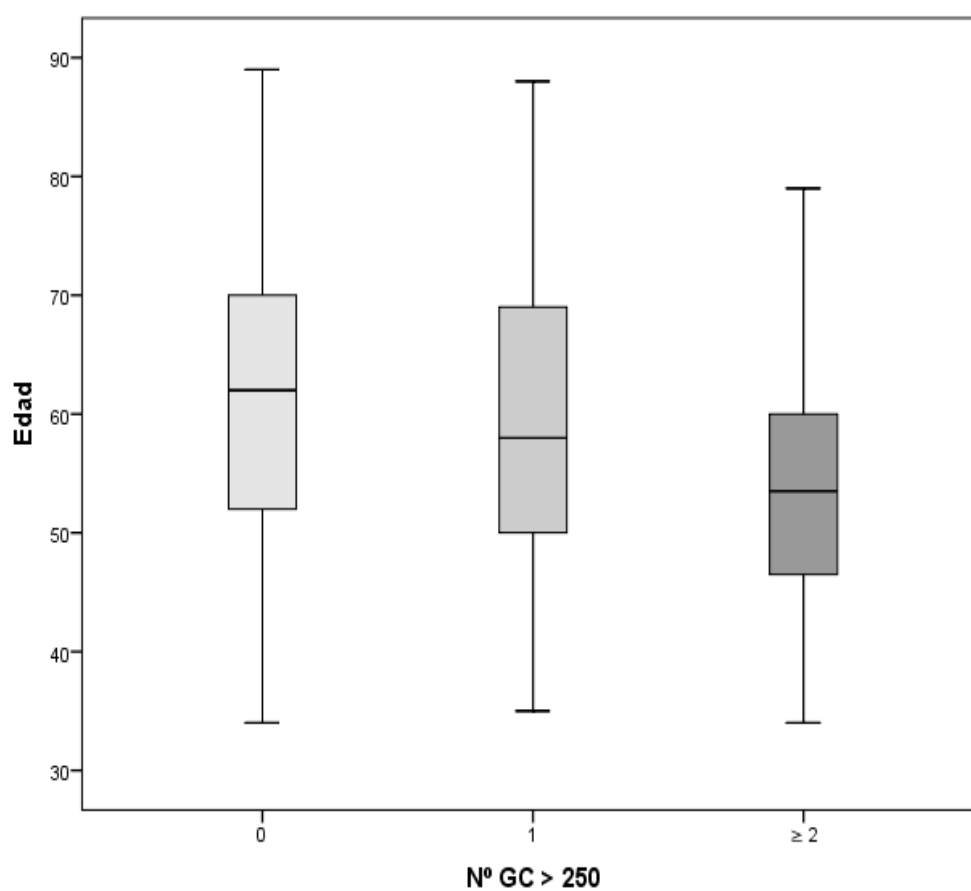


- **Edad y distribución de la carga tumoral.**

No se observó relación significativa con la carga tumoral promedio. En cuanto a la frecuencia GC positivos: el punto de corte de 250 copias para considerar GC positivo, fue el que resultó estadísticamente significativo $p < 0,009$, mientras el punto de corte de 5000 copias no lo fue. En el Gráfico 9 se observa como con el punto de corte de 250 copias la media de edad disminuye según aumenta el número de ganglios positivos. Mientras para el grupo de pacientes que no tenían ganglios positivos la media de edad

fue de $61,11 \pm 12,07$ años, para el grupo de pacientes con un ganglio positivo la media de edad fue de $60,02 \pm 12,84$ años y para el grupo de pacientes con dos o más ganglios positivos la media de edad fue la más baja de $54,03 \pm 11,62$ años.

Gráfico 9: frecuencia GC positivos > 250 copias (**p0,009**).



Nº GC	N	Media	± D.E.
0	259	61,11	12,07
1	121	60,02	12,84
≥ 2	32	54,03	11,62

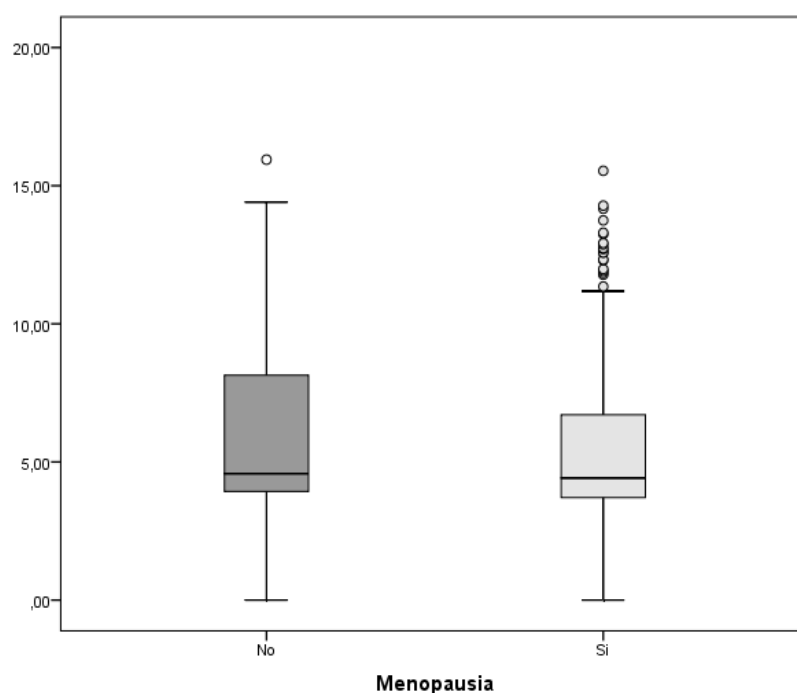
p0,009

2.1.2. Menopausia y carga tumoral OSNA.

- Menopausia y carga tumoral del GC principal.

Las pacientes premenopáusicas obtuvieron mayor media de carga tumoral del GC principal de $6,11 \pm 3,19$ copias mientras las menopáusicas tenían una media menor de $5,44 \pm 2,94$ copias (Gráfico 10), esta asociación fue estadísticamente significativa $p0,035$. Con los puntos de corte de 250 y 5000 no se encontraron asociaciones estadísticamente significativas. Las pacientes premenopáusicas mostraron un mayor porcentaje de ganglios centinela con cargas tumorales por encima de 7700 copias un 21,5% frente a un 12,7% de las pacientes menopáusicas, este resultado fue estadísticamente significativo ($p0,017$).

Gráfico 10: Menopausia y carga tumoral del GC principal (**$p0,035$**).



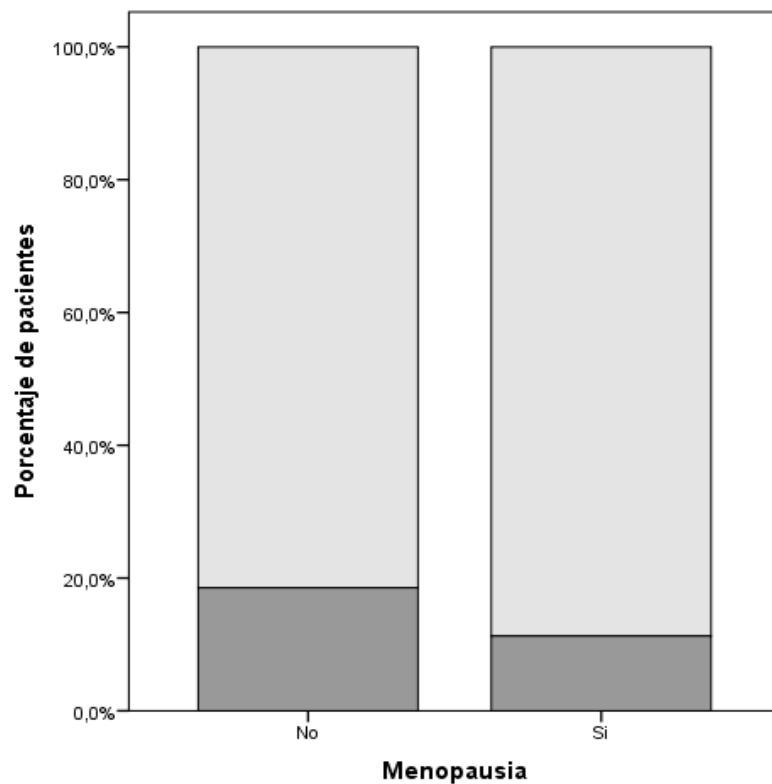
Menopausia	N	Media	±DE
No	135	6,11	3,19
Si	275	5,44	2,94

$p0,035$

- Menopausia y carga tumoral total.

Las pacientes premenopáusicas, presentaron mayor media de carga tumoral total $6,15 \pm 3,24$ copias, al ser comparadas con las pacientes menopáusicas cuya media fue de $5,46 \pm 2,98$ copias, este resultado fue estadísticamente significativo ($p0,033$). De igual manera Se observó como las pacientes premenopáusicas mostraron mayor porcentaje de casos con una carga tumoral total mayor de 15000 copias (Gráfico 11), un 18,5%, mientras las pacientes menopáusicas tenían un 11,3% de casos con carga tumoral total mayor de 15000 copias, este resultado fue estadísticamente significativo $p0,048$.

Gráfico 11: Menopausia y carga tumoral total punto de corte 15000 copias (**$p0,048$**).

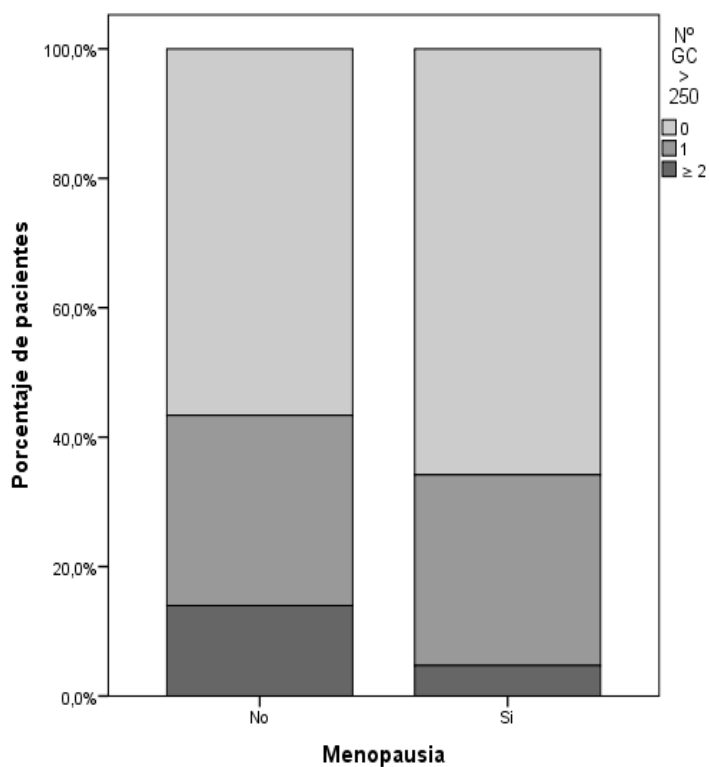


Menopausia		≤15000	> 15000
No	%	81,5%	18,5%
	N	10	25
Si	%	88,7%	11,3%
	N	244	31
p0,048			

- Menopausia y distribución de la carga tumoral.

El estado hormonal de las pacientes no mostró relación con carga tumoral promedio. En las pacientes premenopáusicas Se observó una mayor frecuencia de GC positivos por encima de las 250 copias (Gráfico 12). Esta diferencia, es más evidente en el grupo de pacientes con dos o más ganglios positivos. Para las pacientes premenopáusicas este porcentaje de GC positivos era mayor, un 14,0%, comparado con las pacientes menopáusicas, que obtuvieron un 4,7%, de pacientes con dos o más ganglios positivos, esta relación fue estadísticamente significativa $p0,004$. Con el punto de corte de 5000 copias no se encontró diferencia estadísticamente significativa.

Gráfico 12: frecuencia de GC positivos > 250 copias ($p0,004$).



Menopausia	Nº GC positivos		
	0	1	≥2
No	% 56,6%	29,4%	14,0%
	N 77	40	19
Si	% 65,8%	29,5%	4,7%
	N 181	81	13

$p0,004$

2.1.3. Lateralidad y la carga tumoral OSNA.

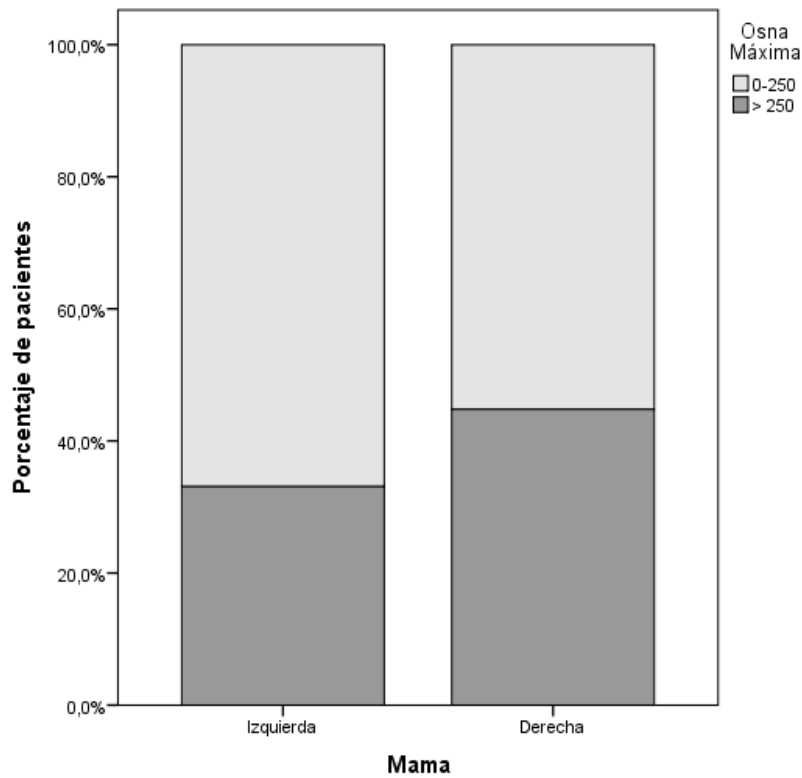
- Lateralidad y carga tumoral del GC principal

La media de carga tumoral del GC principal para los tumores ubicados en la mama izquierda fue de $5,24 \pm 2,64$, mientras que para los tumores ubicados en la mama derecha fue mayor, una media de $6,17 \pm 3,32$, esta relación fue estadísticamente significativa $p0,007$.

Con el punto de corte de 250 se ha podido observar como los tumores localizados en la mama derecha mostraron mayor porcentaje de casos con carga tumoral del GC principal >250 copias un 44,8% mientras que los tumores de la mama izquierda tenían un 33,1%, este resultado fue estadísticamente significativo $p0,041$ (Gráfico 13).

Igualmente los tumores ubicados en la mama derecha tuvieron mayor porcentaje de carga tumoral del GC principal > 7700 copias, un 19,9%, mientras para los tumores ubicados en la mama izquierda un 11,1% esta diferencia resultó estadísticamente significativa $p0,036$. Con el punto de corte de 5000 copias no se encontraron relaciones significativas.

Gráfico 13: Lateralidad y carga tumoral del GC principal punto de corte 250 copias (**p0,041**).

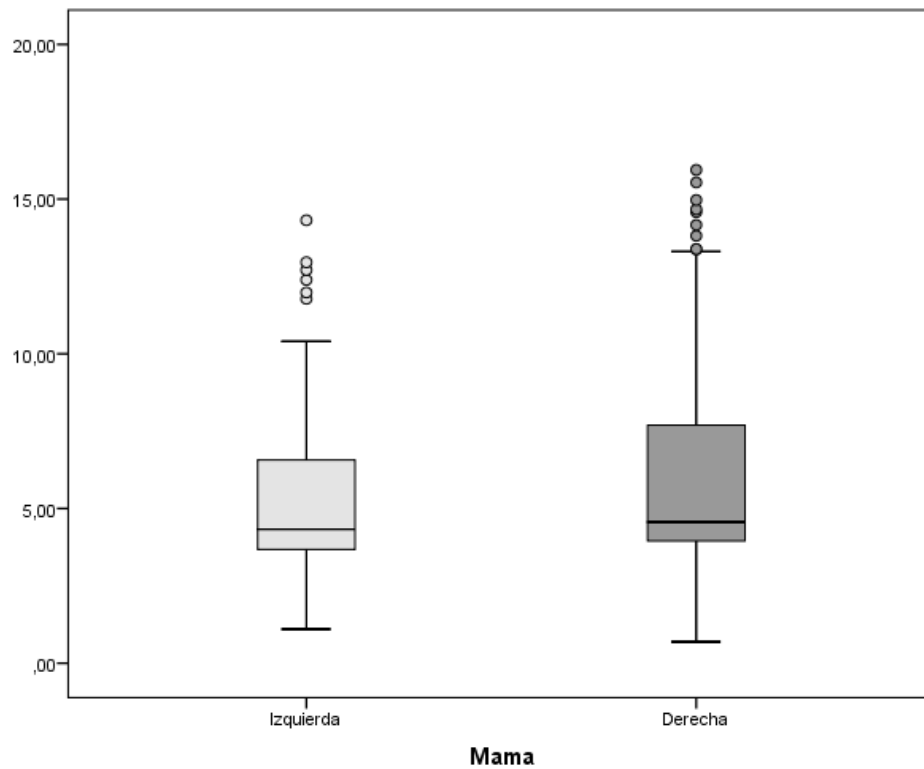


Mama		0-250	> 250
Izquierda	N	91	45
	%	66,9%	33,1%
Derecha	N	111	90
	%	55,2%	44,8%
		p0,041	

- Lateralidad y carga tumoral total.

Las pacientes con el tumor localizado en la mama derecha, mostraron una media mayor de carga tumoral total de $6,20 \pm 3,38$, al ser comparado con los tumores ubicados en la mama izquierda con una media de $5,26 \pm 2,66$ (Gráfico 14), estos resultados fueron estadísticamente significativos $p0,007$. Con el punto de corte de 15000 copias no se observaron diferencias significativas estadísticamente.

Gráfico 14: Lateralidad y carga tumoral total (**p0,007**).



Mama	N	Media	±D.E
Izquierda	135	5,26	2,66
Derecha	201	6,20	3,38

p0,007

- Lateralidad y distribución de la carga tumoral.

No se encontraron relaciones significativas con ninguna de las variables de este grupo.

2.2. Estudio univariante entre las variables radiológicas y carga tumoral OSNA.

Las variables radiológicas: Número de lesiones radiológicas, Tipo de foco (único, multifocal, multicéntrico) y el Tamaño del foco, mostraron relaciones estadísticamente significativas con la mayoría de las variables de la carga tumoral OSNA. Mientras que la realización de PAAF previa, únicamente mostró relación con una variable de la distribución de la carga tumoral. Se observa en la Tabla 20 las asociaciones estadísticamente significativas en recuadros grises, a continuación se explican estas relaciones encontradas.

Tabla 20: Estudio univariante entre las variables radiológicas y la carga tumoral OSNA.

Carga tumoral OSNA	Radiológicas			
	PAAF	Nº lesiones	Tipo de Foco	Tamaño Tot.
Carga Tumoral del GC principal				
Carga Tumoral del GC principal				
250				
5000				
7700				
Carga tumoral total				
Carga tumoral total				
15000				
Distribución de la carga tumoral				
Carga tumoral Promedio				
Frecuencia GC positivos				
> 250				
> 5000				

Recuadros Grises: Relación significativa $p < 0,05$

Recuadros Blancos: Relación No significativa

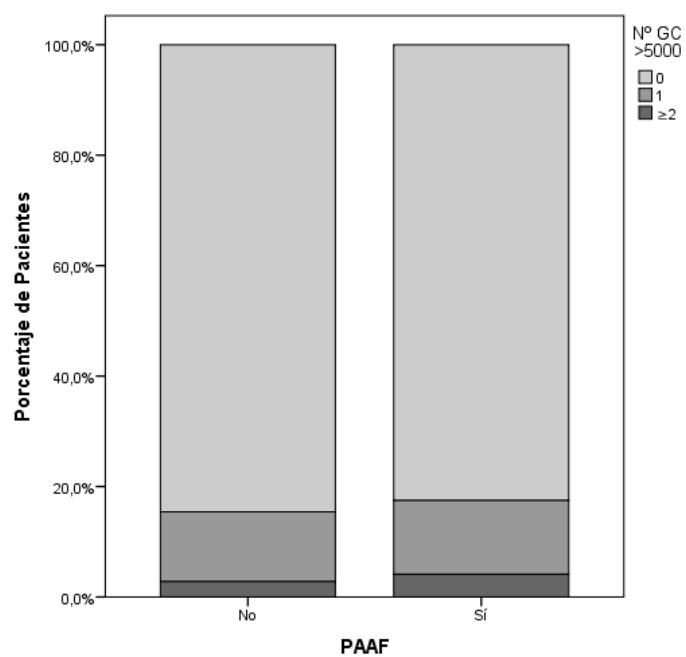
2.2.1. PAAF y Carga tumoral OSNA.

- PAAF y carga tumoral del GC principal: No se encontraron relaciones significativas entre estas variables.
- PAAF y carga tumoral total: No se encontraron relaciones significativas entre estas variables.
- PAAF y distribución de la carga tumoral.

No se encontraron relaciones significativas entre la realización de PAAF y la carga tumoral promedio. En cuanto a la frecuencia de GC, solo se encontró relación entre PAAF y el punto de corte de 5000 copias y no con el de 250 copias.

El porcentaje de ganglios negativos (<5000 copias) es mayor en las pacientes que no se realizaron PAAF, un 86,4%, mientras que, el porcentaje para las pacientes en quienes se realizó PAAF, fue de 75,0%. El porcentaje de pacientes con un ganglio positivo (>5000 copias) fue mayor para pacientes con PAAF, un 15,9%, frente a las pacientes sin PAAF que fue de 12,7%. Igualmente ocurre con las pacientes con dos o más ganglios positivos (>5000 copias), en aquellas a quienes se realizó PAAF el porcentaje de casos con dos o más ganglios positivos fue 9,1% frente a un 2,8% de casos en pacientes sin PAAF, estos resultados fueron estadísticamente significativos $p=0,033$ (Gráfico 15).

Gráfico 15: PAAF y frecuencia de GC > 5000 copias (**p0,033**).



		Nº GC con > 5000 copias		
PAAF		0	1	≥2
No	%	84,6%	12,7%	2,8%
	N	274	41	9
Sí	%	75,0%	15,9%	9,1%
	N	66	14	8

p0,033

2.2.2. Número de lesiones radiológicas y carga tumoral OSNA.

- Número de lesiones radiológicas carga tumoral del GC principal.

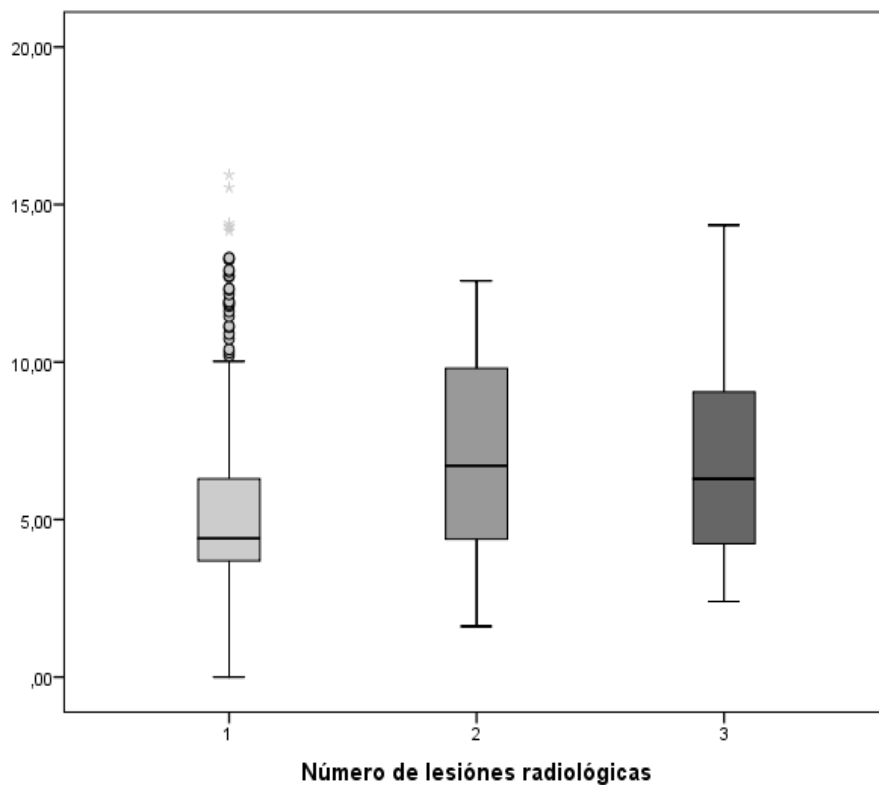
Todas las asociaciones exploradas entre el número de lesiones radiológicas y la carga tumoral carga tumoral OSNA con los diferentes puntos de corte resultaron estadísticamente significativas. Se observó mediante este análisis, que a mayor número de lesiones radiológicas mayor carga tumoral del GC principal (Gráfico 16), con un coeficiente de correlación de Pearson de 0,193, (p0,000).

Con el punto de corte de 250 copias de carga tumoral en el GC principal, las pacientes con >250 copias, tuvieron una media de $1,29 \pm 0,70$ de número de lesiones radiológicas. Mientras que las pacientes con ganglios <250 copias, la media resultó menor, mostraron una media de $1,12 \pm 0,46$ de número de lesiones radiológicas, estos resultados fueron estadísticamente significativos (p0,003).

Esta misma tendencia se observó con el punto de corte de 5000 copias y el de 7700 copias y los resultados fueron estadísticamente significativos (p0,000) en ambos casos. El número de lesiones radiológicas fue mayor para las pacientes con carga tumoral en el GC principal > 7700, una media de $1,46 \pm 0,934$ lesiones radiológicas; mientras que para las pacientes con < 7770 copias, la media fue de $1,14 \pm 0,46$ de lesiones radiológicas.

La media de número de lesiones radiológicas para las pacientes carga tumoral en el GC principal <250 copias o negativos, fue de $1,12 \pm 0,46$ lesiones radiológicas, para las pacientes con carga tumoral en el GC principal entre 250-5000 copias o micrometástasis la media fue de $1,16 \pm 0,44$, de lesiones radiológicas. La mayor diferencia se observó en las pacientes con >5000 copias cuya media fue de $1,45 \pm 0,89$ lesiones radiológicas, y esta asociación fue estadísticamente significativa p0,000

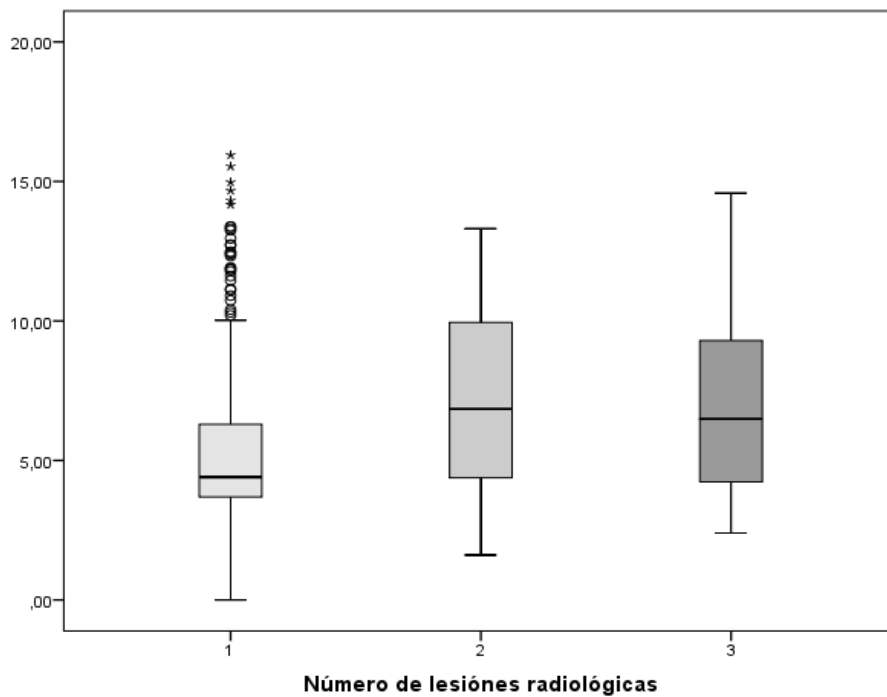
Gráfico 16: Número de lesiones radiológicas carga tumoral del GC principal (**p0,000**).



- Número de lesiones radiológicas y carga tumoral total

Se observó que, a mayor número de lesiones radiológicas, mayor carga tumoral total (Gráfico 17), con un Índice de correlación de Pearson 0,193, esta asociación fue estadísticamente significativa (p0,000). Igualmente, las pacientes con una carga tumoral total mayor de 15000 copias tuvieron una media mayor de número de lesiones radiológicas de $1,40 \pm 0,89$. Mientras que, la media para el grupo con carga menor o igual de 15000 copias fue de $1,15 \pm 0,49$ lesiones radiológicas y esta asociación fue estadísticamente significativa (p0,002).

Gráfico 17: Número de lesiones radiológicas y carga tumoral total (**p0,000**).



- Número de lesiones radiológicas y distribución de la carga tumoral.

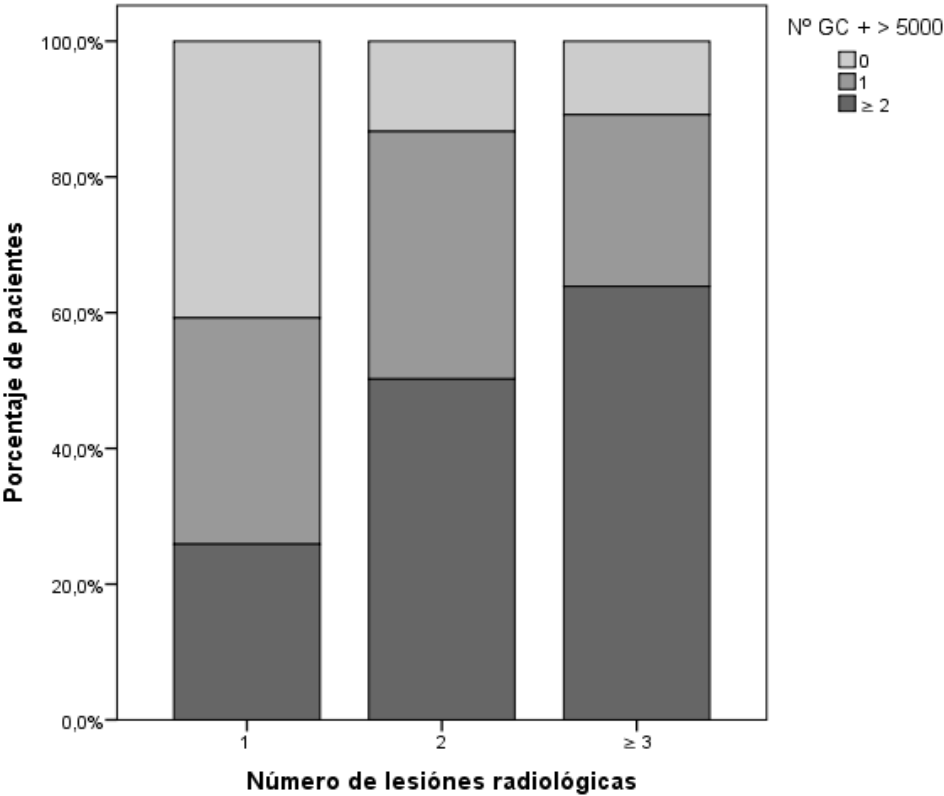
Se encontró una relación directamente proporcional, entre el número de lesiones radiológicas y la carga tumoral promedio, con un coeficiente de correlación de pearson 0,190 y esta asociación fue estadísticamente significativa ($p0,015$).

Para la frecuencia de GC positivos se observó como la media de lesiones radiológicas aumenta mientras mayor sea la cantidad de GC positivos de cada paciente, en las pacientes con un ganglio positivo con una carga igual o mayor a 250 copias, la media de número de lesiones radiológicas fue de $1,22 \pm 0,51$. Las pacientes con dos o más ganglios positivos tuvieron una media de $1,59 \pm 1,15$ de número de lesiones radiológicas, estos resultados fueron estadísticamente significativos ($p0,000$).

Cuando el punto de corte para GC positivo fue de 5000 copias, ocurrió lo mismo que en el grupo anterior, siendo también resultados estadísticamente significativos $p0,000$. La media de lesiones radiológicas fue aumentando según la cantidad ganglios

con más de 5000 copias (Gráfico 18). Las pacientes con ningún ganglio por encima de las 5000 copias la media fue de $1,13 \pm 0,45$ lesiones radiológicas. Las pacientes con un ganglio positivo tuvieron una media de $1,36 \pm 0,71$ lesiones radiológicas. Las pacientes con dos o más ganglios por encima de 5000 copias la media de lesiones radiológicas fue de $1,79 \pm 1,37$

Gráfico 18: Número de lesiones radiológicas y frecuencia de GC positivos > 5000 copias (**p0,000**).



Nº Lesiones Radiológicas			
Nº GC + > 5000	N	Media	± D.E
0	330	1,13	0,45
1	53	1,36	0,71
≥ 2	14	1,79	1,369
p0,000			

2.2.3. Foco Único o múltiple y carga tumoral OSNA.

- Foco único o múltiple y carga tumoral del GC principal.

Igualmente como en el grupo anterior, todas las asociaciones exploradas entre el Foco Único o múltiple y la carga tumoral OSNA con los diferentes puntos de corte resultaron estadísticamente significativas. La media de carga tumoral del GC principal para las pacientes con tumores únicos fue de $5,39 \pm 2,90$. Mientras para las pacientes con tumores multifocales la media fue mayor de $6,74 \pm 3,26$ copias. La mayor media registrada, fue la de las pacientes con tumores multicéntricos, de $7,55 \pm 3,73$ copias ($p < 0,000$) (Gráfico 19).

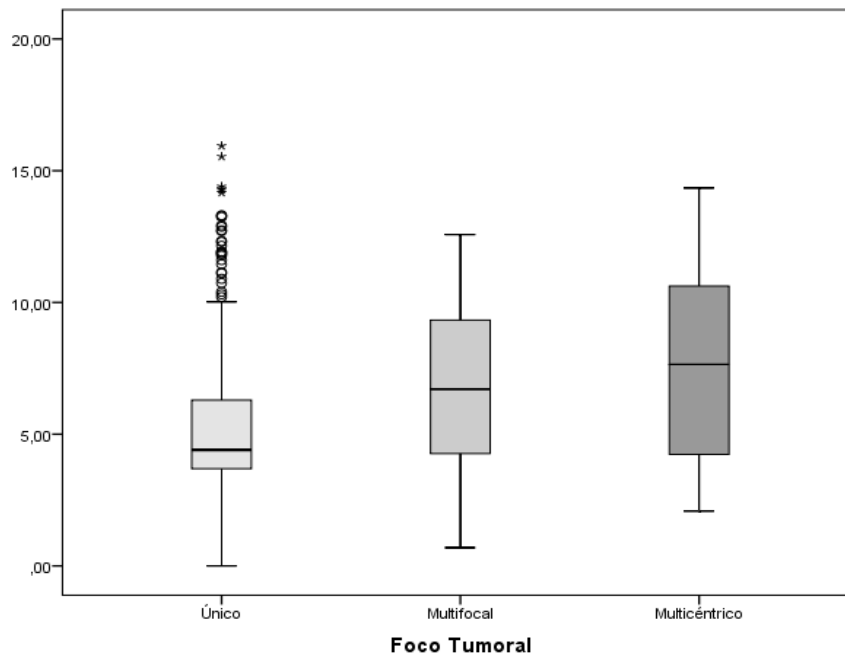
Utilizando el punto de corte de 250 copias, las pacientes con tumores únicos mostraron un porcentaje menor de casos con carga tumoral del GC principal mayor de 250 copias, un 33,3%, mientras que las pacientes con tumores multifocales tenían un 58,3% de casos. Las pacientes con tumores multicéntricos son las que mostraron el mayor valor, un 57,7% de casos con carga tumoral del GC principal mayor de 250 copias, este resultado fue estadísticamente significativo ($p < 0,001$).

Con el punto de corte de 5000, las pacientes con tumores multicéntricos son las que obtuvieron mayor porcentaje de carga tumoral del GC principal > 5000 copias o macrometástasis, un 46,2% de casos. Mientras que, las pacientes con tumores multifocales, tuvieron un 33,3%, y las pacientes con tumores únicos, un 13,6%. Las pacientes con tumores multifocales tuvieron el mayor porcentaje de carga tumoral del GC principal entre 250-5000 copias o micrometástasis, un 25,0%. Las pacientes con tumores únicos tuvieron un 19,7% de casos, mientras que las pacientes con tumores multicéntricos tuvieron un 11,5%, estos resultados fueron estadísticamente significativos ($p < 0,000$).

El porcentaje de pacientes con carga tumoral del GC principal por encima de 7700 copias, fue mayor para las pacientes con tumores multifocales y multicéntricos. Siendo respectivamente 12,2%, de casos para los tumores únicos, 28,6% de casos para

los tumores multifocales y 42,3% de casos para tumores multicéntricos, este resultado fue estadísticamente significativo ($p0,000$).

Gráfico 19 Foco Único o múltiple y carga tumoral del ganglio principal ($p0,000$)



Carga tumoral del GC principal			
Foco	N	Media	\pm D.E.
Único	345	5,39	2,90
Multifocal	35	6,74	3,26
Multicéntrico	26	7,55	3,73

$p0,000$

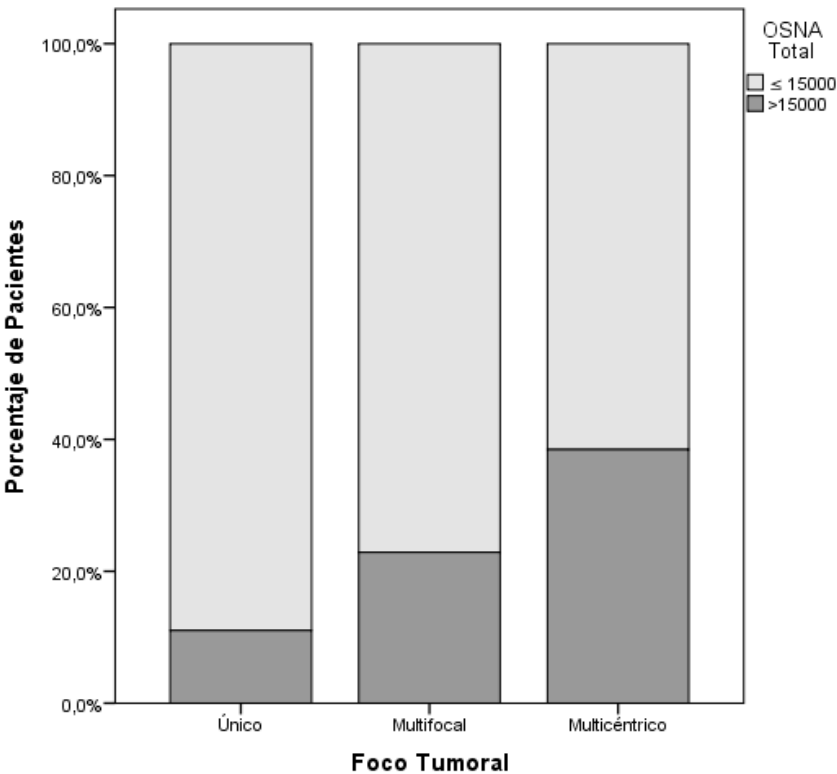
- Foco único o múltiple y carga tumoral total.

La media de carga tumoral total fue mayor para los tumores multifocales y multicéntricos. La media para los tumores únicos fue de $5,41 \pm 2,93$, mientras que para los multifocales $6,80 \pm 3,33$ y para los multicéntricos $7,65 \pm 3,82$, este resultado fue estadísticamente significativo $p0,000$.

El porcentaje de pacientes con carga tumoral total de >15000 copias es mayor para aquellas pacientes con tumores multicéntricos o multifocales. El porcentaje de pacientes con > 15000 copias, para tumores únicos, fue de 11,0%, mientras que, para los tumores multifocales y multicéntricos fue de 22,9% y 38,5% respectivamente, estos

resultados fueron estadísticamente significativos p0,000. Gráfico 32. Para este grupo los resultados pierden validez estadística, por no superar el número mínimo de casos, en cada uno de los supuestos de la tabla de contingencia.

Gráfico 20: Foco Único o múltiple y carga tumoral total punto de corte 15000 copias (p0,000).



Foco	≤ 15000	> 15000
Único	89,0%	11,0%
Multifocal	77,1%	22,9%
Multicéntrico	61,5%	38,5%

p0,000

- Foco único o múltiple y distribución de la carga tumoral.

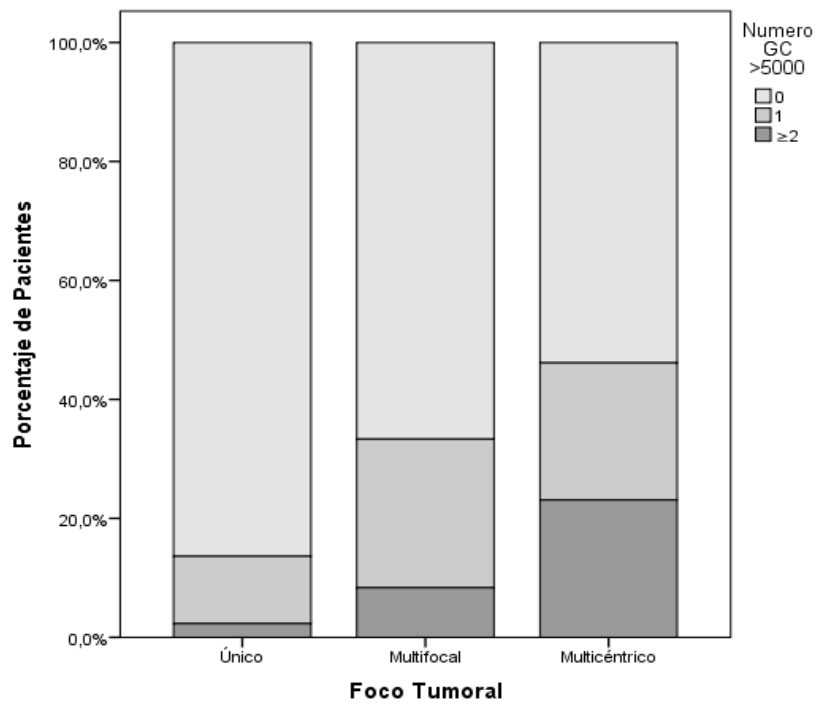
La media de la carga tumoral promedio fue mayor para las pacientes con tumores multicéntricos, de $10,07 \pm 2,24$ copias. Para las pacientes con tumores multifocales la media fue de $8,75 \pm 2,13$ copias, y para los tumores únicos, la media fue de $8,08 \pm 2,80$ copias, este resultado fue estadísticamente significativo p0,020.

Para la frecuencia GC positivos utilizando el punto de corte de 250 copias, Se observó como los tumores multifocales eran los que tuvieron mayor porcentaje de

pacientes con un ganglio positivo un 47,2 %. Por su parte, los tumores únicos un 27,2% y los multicéntricos un 26,9%, de casos con un solo GC positivo. En cuanto a las pacientes con dos o más ganglios positivos, fueron los tumores multicéntricos, los que tuvieron mayor porcentaje de casos, un 30,8%. Mientras que los tumores multifocales un 11,1% y los únicos un 5,8% de casos con dos o más GC >250 copias, esta asociación fue estadísticamente significativa ($p=0,000$).

Cuando el punto de corte para frecuencia GC positivos, se estableció en 5000 copias, Se observó nuevamente como el mayor porcentaje de pacientes con un ganglio positivo, lo tenían los tumores multifocales con un 25,0% de casos, mientras los tumores multicéntricos tuvieron 23,1% de casos y los tumores únicos 11,3% de pacientes con un único ganglio positivo (Gráfico 21). El mayor porcentaje de pacientes con dos ganglios positivos lo obtuvieron las pacientes con tumores multicéntricos un 23% de casos, mientras las pacientes con tumores multifocales 8,3% y con tumores únicos 2,3% de casos, estos resultados fueron estadísticamente significativos ($p=0,000$) (Gráfico 21).

Gráfico 21: Foco único o múltiple y frecuencia GC positivos > 5000 copias (**p0,000**).



NºGC + > 5000			
Foco	0	1	≥ 2
Único	86,4%	11,3%	2,3%
Multifocal	66,7%	25,0%	8,3%
Multicéntrico	53,8%	23,1%	23,1%

p0,000

2.2.4. Tamaño Radiológico Total y carga tumoral OSNA.

- Tamaño radiológico total y carga tumoral del GC principal.

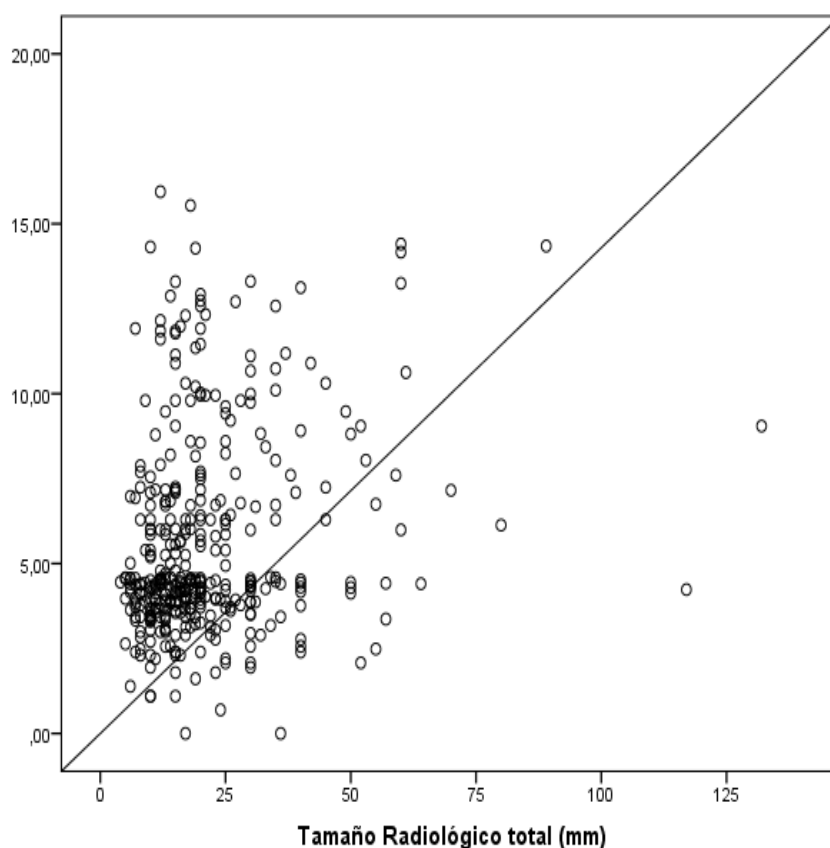
El tamaño radiológico y la carga tumoral del GC principal mostraron una correlación directamente proporcional, con un coeficiente de correlación de Pearson de 0,207, esta asociación fue estadísticamente significativa ($p=0,000$) (Gráfico 22)

Las pacientes con carga tumoral del GC principal >250 copias, tuvieron una media de tamaño radiológico del tumor de $25,06 \pm 17,67$ mm, mayor que las pacientes con carga tumoral del GC principal <250 , que tuvieron una media de $18,90 \pm 12,56$ mm, este resultado fue estadísticamente significativo ($p=0,000$).

Las pacientes con carga tumoral del GC principal de 0 a 250 copias tuvieron un tamaño radiológico de $18,90 \pm 12,56$ mm, menor que el de las pacientes con carga tumoral del GC principal de 250-5000, cuya media fue de $22,42 \pm 14,72$ mm. Las pacientes con carga tumoral del GC principal >5000 , fueron las que presentaron la mayor media de tamaño radiológico total, $28,23 \pm 20,33$ mm. Estos resultados fueron estadísticamente significativos ($p=0,000$).

Cuando la carga tumoral del GC principal superaba las 7700 copias, se asociaba a una media de tamaño radiológico de $28,25 \pm 21,08$ mm. Mientras para las pacientes con carga tumoral del GC principal menor a 7700 copias, la media de tamaño radiológico fue menor, de $19,98 \pm 13,25$ mm, y esta asociación fue estadísticamente significativa ($p=0,000$).

Gráfico 22: Tamaño Radiológico Total y carga tumoral del GC principal (**p0,000**)

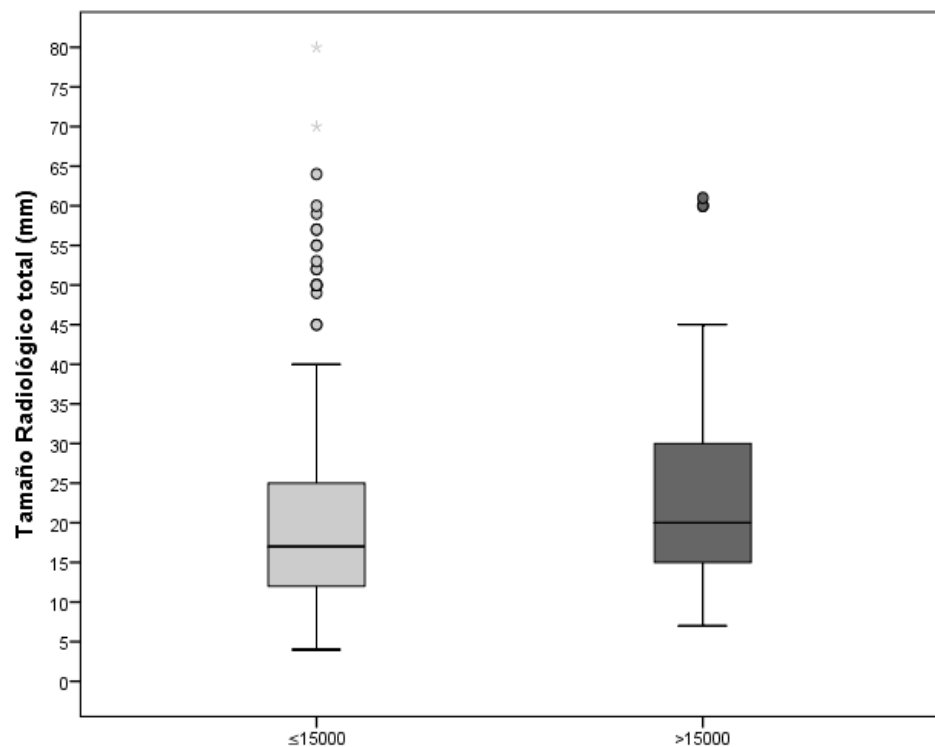


- Tamaño radiológico total y carga tumoral total.

Se ha observado mediante este análisis como a mayor tamaño radiológico, mayor era la carga tumoral total, con un índice de correlación de Pearson de 0,207 y esta asociación fue estadísticamente significativa (p0,007).

El grupo de pacientes cuya carga tumoral total sumaba, más de 15000 copias, tuvieron una mayor media de tamaño radiológico, $26,08 \pm 16,17\text{mm}$. Mientras que, el grupo de pacientes con < 15000 copias, la media de tamaño era menor, de $20,49 \pm 14,68\text{mm}$, esta asociación fue estadísticamente significativa (p0,012) (Gráfico 23).

Gráfico 23: Tamaño Radiológico Total y carga tumoral total punto de corte de 15000 copias (p0,012)



Tamaño Total (milímetros)					
copias	N	Media	± D.E	Min.	Max.
≤ 15000	331	20,49	14,680	4	132
>15000	52	26,08	16,168	7	89

p0,012

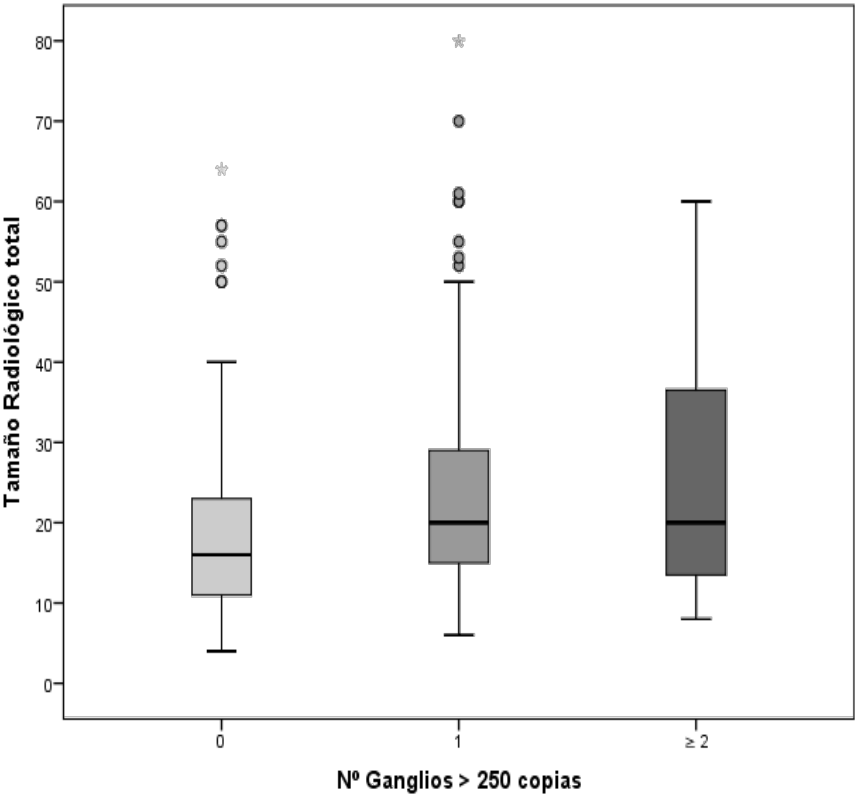
- Tamaño radiológico total y distribución de la carga tumoral.

Se observó una relación entre el tamaño radiológico y la carga tumoral promedio, mientras mayor tamaño tumoral, mayor número de copias, con un Índice de correlación de Pearson de 0,182 y esta asociación fue estadísticamente significativa p0,021.

Para la frecuencia GC positivos > 250 copias, se observó que la media de tamaño aumentaba según el número de GC >250. Para las pacientes con un ganglio positivo, la media fue de 23,77 ± 14,40mm. Mientras que las pacientes con dos o más GC >250, registraron una mayor media de tamaño radiológico de 30,61 ± 27,25mm, este resultado fue estadísticamente significativo p0,000 (Gráfico 25).

Con el punto de corte de 5000 copias, mientras mayor número de GC >5000 copias, mayor tamaño radiológico. La mayor media de tamaño radiológico, la registraron las pacientes con dos o más ganglios positivos, una media de $29,57 \pm 21,10$ mm de tamaño radiológico tumoral, esta asociación fue estadísticamente significativa ($p<0,000$).

Gráfico 24 Tamaño Radiológico Total y frecuencia de GC + > 250 copias (**p0,000**)



Tamaño (mm)			
NºGC +	N	Media	± D.E.
0	240	18,90	12,53
1	116	23,77	14,40
≥ 2	28	30,61	27,25

$p<0,000$

2.3. Estudio univariante entre las variables histológicas y la carga tumoral OSNA.

La mayoría de las Variables Histológicas mostraron asociación con la carga tumoral OSNA, este es el grupo donde se encontraron la mayor cantidad de relaciones estadísticamente significativas. Una excepción fue el componente intraductal extenso, que no resultó asociado a la carga tumoral OSNA, y las variables número de focos AP y tipo histológico tumoral, que no mostraron relación con todas las variables de la carga tumoral OSNA, como se observa en la (Tabla 21), las variables con relaciones estadísticamente significativas se encuentran señaladas con recuadro grises.

Es importante destacar que se observó diferentes asociaciones entre la variable número de lesiones radiológicas y la variable número de focos AP entre, en las correlaciones estadísticamente significativas para el número de lesiones radiológicas se observó relación ($p < 0,005$) con todas las variables de la carga tumoral OSNA, mientras que en el número de focos AP la cantidad de relaciones estadísticamente significativas fue menor.

En cuanto a la variable tipo histológico, el tipo histológico lobulillar se asoció a mayor carga tumoral promedio y a mayor número de ganglios positivos con mas de 5000 copias, con el resto de variables de la carga tumoral OSNA no se encontraron asociaciones estadísticamente significativas con el tipo histológico tumoral.

Tabla 21: Estudio univariante entre las variables histológicas y la carga tumoral OSNA

Carga tumoral OSNA	Histológicas							
	Estadio pT	Tamaño total	Tamaño foco	Nº Focos AP	Tipo Hist.	Comp. ID	Grado	Infil. piel
Carga Tumoral del GC principal								
Carga Tumoral del GC principal								
250								
5000								
7700								
Carga tumoral total								
Carga tumoral total								
15000								
Distribución de carga tumoral								
Carga tumoral Promedio								
Frecuencia GC positivos								
> 250								
> 5000								

Recuadros Grises: Relación significativa $p < 0,05$

Recuadros Blancos: Relación No significativa

2.3.1. Estadío pT y carga tumoral OSNA.

- Estadio pT y carga tumoral del GC principal.

La media de la carga tumoral del GC principal aumentaba según mayor era el estadio. Así, en los tumores con estadio pT1mic, la media fue la menor de $4,01 \pm 2,10$ copias, mientras la mayor media fue la del estadio pT3 de $9,28 \pm 3,85$ copias, este resultado fue estadísticamente significativo ($p0,025$).

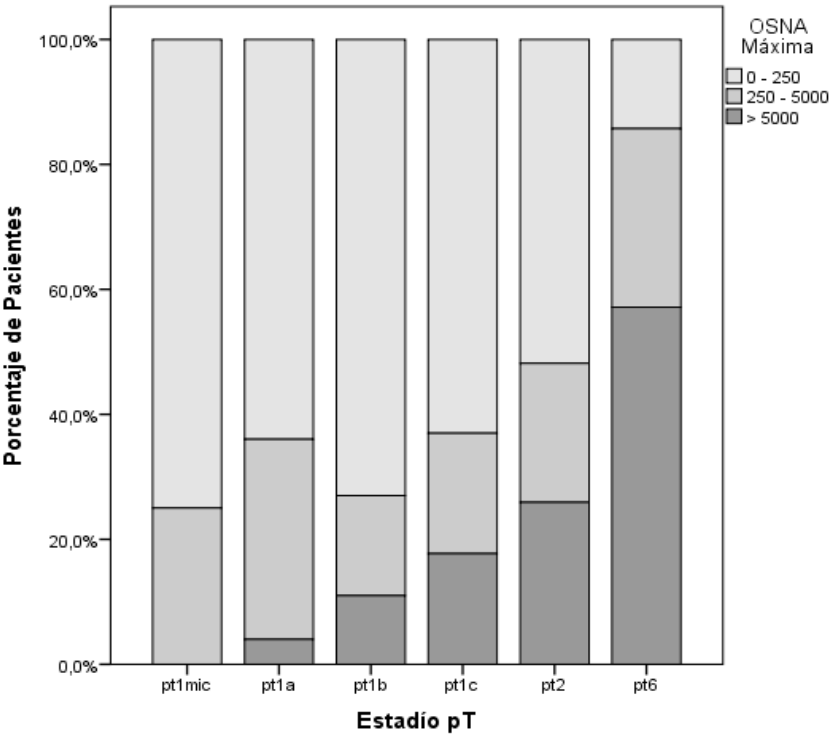
Utilizando el punto de corte de 250 copias, las pacientes con tumores en estadios pT2 y pT3 mostraron un mayor porcentaje de carga tumoral del GC principal > 250. El porcentaje de pacientes con > 250 copias en el ganglio principal, por cada estadio fue la siguiente: pt1mic 25,0%; pt1a 36,0%; pt1b 27,0%; pt1c 37,0% pt2 48,1%; pt3 85,7%, este resultado fue estadísticamente significativo ($p0,007$). Sin embargo, pierde validez por tener un porcentaje 33,3% de celdas con pocos casos durante el análisis estadístico.

Nuevamente con el punto de corte de 5000 copias las pacientes con tumores en estadios pT2 y pT3 tienen mayor porcentaje de carga tumoral del GC principal > 5000 copias. El porcentaje de ganglios con más de 5000 copias según el estadio pt es el siguiente: pt1mic 0%; pt1a 4,0%; pt1b 11,0%, pt1c 17,7%; pt2 25,9%; pt3 57,1%. Lo observado con las macrometástasis (>5000 copias) no ocurre cuando el ganglio centinela principal tiene un resultado de 250-5000 copias o micrometástasis, ya que el número de casos este grupo fue diferente para cada el estadio: pt1mic 25,0%; pt1a 32,0%; pt1b 16,0%; pt1c 19,3%; pt2 22,2%; pt3 28,6%. Estos resultados fueron estadísticamente significativa ($p0,006$), sin embargo, pierden validez estadística porque se observó un 38,9% de celdas con pocos casos (Gráfico 25).

Con el punto de corte de 7700 copias se vuelve a observar que mientras mayor era el estadio pT, mayor era el porcentaje de casos con carga tumoral del GC principal mayor de 7700 copias. El estadio pT1mic tenía un 100% de pacientes con carga tumoral del GC principal menor o igual a 7700 copias. Mientras que las pacientes con

tumores en estadio pT3, un 42,9% tienen una carga tumoral del GC principal por encima de 7700 copias y un 57,1% de pacientes igual o menor a 7700 copias, este resultado fue estadísticamente significativo p0,039.

Gráfico 25: Estadío pT y carga tumoral del GC principal punto de corte 5000 copias (p0,006)

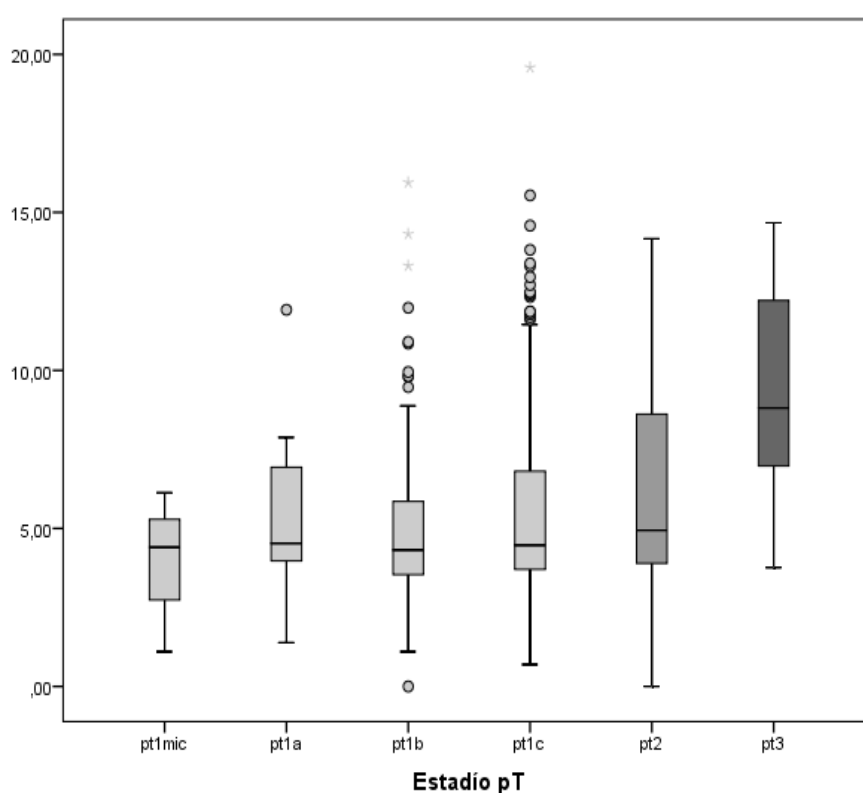


	0-250		250-5000		> 5000	
Estadio pT	N	%	N	%	N	%
pT1mic	3	75,0	1	25,0	0	0
pT1a	16	64,0	8	32,0	1	4,0
pT1b	73	73,0	16	16,0	11	11,0
pT1c	121	63,0	37	19,3	34	17,7
pT2	42	51,9	18	22,2	21	25,9
pT3	1	14,3	2	28,6	4	57,1
p0,006						

- Estadio pT y carga tumoral total.

La carga tumoral total, aumentaba proporcionalmente según aumentaba el estadio pt: la mayor media fue para el estadio pt3, una media de $9,37 \pm 3,87$ copias de carga tumoral total, y la menor fue la del estadio pt1mic una media de $4,01 \pm 2,10$ copias, y esta asociación fue estadísticamente significativa $p0,024$ (Gráfico 26). Utilizando el punto de corte de 15000 copias no se encontraron relaciones significativas.

Gráfico 26 Estadio pT y carga tumoral total ($p0,024$)



Estadio	N	Media	$\pm D.E$
pT1mic	4	4,01	2,10
pT1a	25	5,33	2,12
pT1b	100	5,08	2,74
pT1c	192	5,72	3,18
pT2	81	6,16	3,17
pT3	7	9,37	3,88

$p0,024$

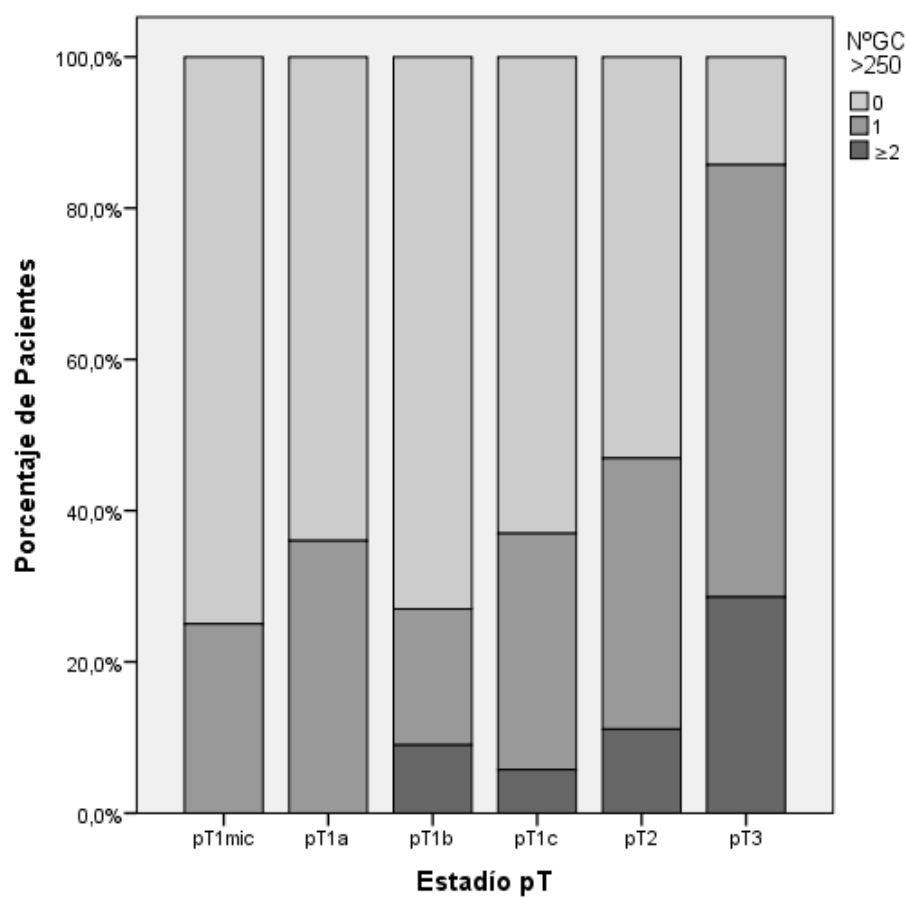
- Estadio pT y distribución de carga tumoral.

Con la carga tumoral promedio no se evidenció diferencia estadísticamente significativa.

En el análisis de la frecuencia de ganglios positivos > 250 copias las pacientes con tumores en estadio pT2 y pT3, mostraron un mayor porcentaje de casos de GC positivos o mayores de 250 copias (Gráfico 27). Las pacientes con tumores en estadio pT3 tuvieron un 28,6% de casos con dos o más ganglios positivos o >250 copias; y un 57,1 % de casos con un GC >250 copias. Mientras que las pacientes con tumores en estadio pT1a no tuvieron ningún caso con dos o más GC >250 copias, y un 36,0 % de casos con un GC >250 copias, estos resultados fueron estadísticamente significativos $p=0,014$.

Con el punto de corte para GC positivos de > 5000 copias, nuevamente fueron las pacientes con tumores en estadio pT3 las que mostraron un mayor porcentaje de casos GC > 5000. Los tumores en estadio pT3 tuvieron un 14,3% de casos con dos o más GC > 5000; un 42,9 % de casos con un GC > 5000. Mientras que, los tumores con estadio pT1a, no mostraron ningún caso con dos o más GC > 5000, y un 4,0 % de casos con un GC > 5000 ($p=0,021$).

Gráfico 27 Estadío pT y frecuencias de GC positivos > 250 copias (**p0,014**)



NºGC + > 250 copias						
Estadio	0		1		≥ 2	
pT	N	%	N	%	N	%
pT1mic	3	75,0	1	25,0	0	0,0
pT1a	16	64,0	9	36,0	0	0,0
pT1b	73	73,0	18	18,0	9	9,0
pT1c	121	63,0	60	31,3	11	5,7
pT2	43	53,1	29	35,8	9	11,1
pT3	1	14,3	4	57,1	2	28,6

p0,014

2.3.2. Tamaño histológico total y carga tumoral OSNA.

- Tamaño histológico total y carga tumoral del GC principal.

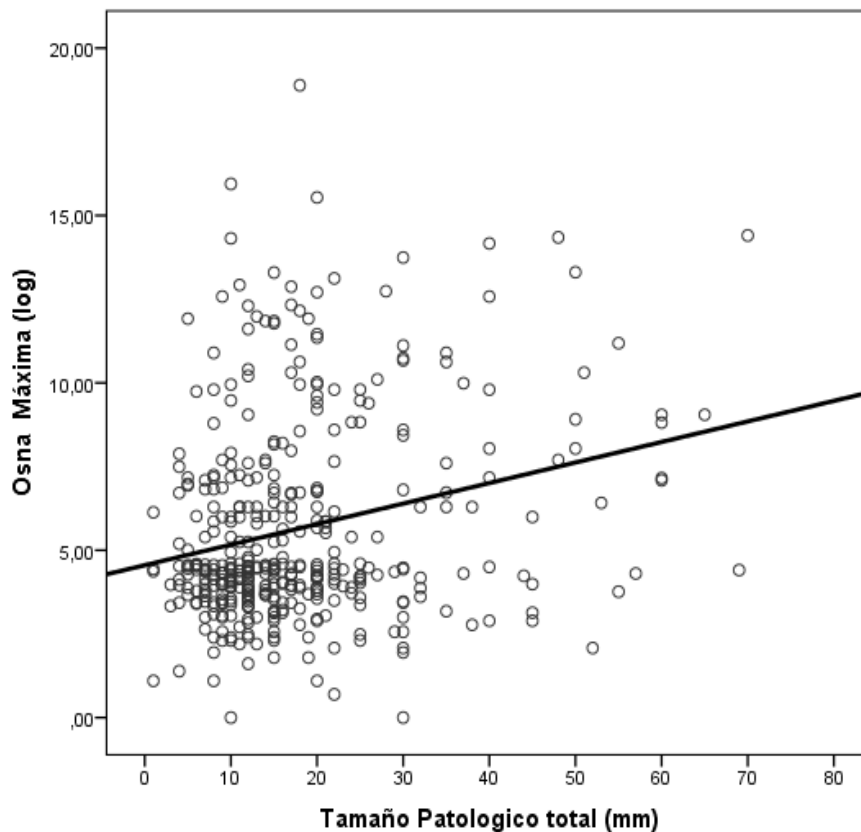
Todas las exploraciones realizadas entre el Tamaño histológico total y carga tumoral del GC principal, resultaron estadísticamente significativas. Se ha encontrado asociación entre el Tamaño histológico total y la carga tumoral del GC principal con un coeficiente de Correlación de Pearson de 0,921 mientras mayor tamaño mayor carga tumoral (Gráfico 28). Al ser el valor del coeficiente cercano a 1, se considera una relación fuerte ($p < 0,005$).

En las pacientes con carga tumoral del GC principal > 250 copias se observó una media de $21,58 \pm 15,16$ mm de Tamaño histológico, mayor que la media de las pacientes con < 250 copias, de $15,71 \pm 10,06$ mm ($p < 0,000$).

Utilizando un punto de corte de 5000 copias para la carga tumoral del GC principal, fueron las pacientes con $>$ de 5000 copias (macrometástasis) las que mostraron una media mayor de Tamaño histológico total de $25,37 \pm 16,63$ mm. Mientras las pacientes con carga tumoral del GC principal entre 250-5000 copias (micrometástasis), mostraron una media de $18,29 \pm 12,99$ mm de Tamaño histológico total. La menor media de Tamaño histológico total la obtuvieron las pacientes con carga tumoral del GC principal entre 0-250 copias, una media de $15,71 \pm 10,06$ mm de tamaño radiológico total ($p < 0,000$).

Las pacientes con carga tumoral del GC principal por encima de 7700 copias mostraron una media mayor de Tamaño histológico total, de $21,58 \pm 16,63$ mm, frente a las pacientes con menor o igual a 7700 copias, con una media de Tamaño histológico total de $16,65 \pm 11,21$ mm ($p < 0,000$).

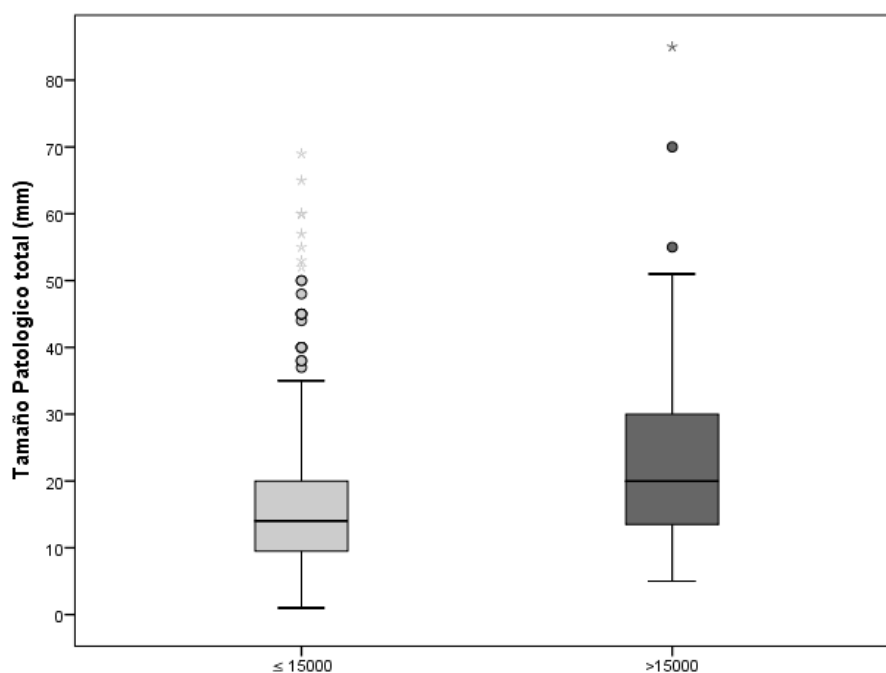
Gráfico 28 Tamaño histológico total y carga tumoral del GC principal (p0,005)



- Tamaño histológico total y carga tumoral total

Las dos asociaciones estudiadas entre el tamaño tumoral y la carga tumoral total mostraron relación estadísticamente significativa. Se ha encontrado que a mayor Tamaño histológico total mayor fue la carga tumoral total, con un coeficiente de correlación de Pearson de 0,253 (p0,000). Las pacientes con una carga tumoral total mayor de 15000 copias tuvieron una media mayor de Tamaño histológico total de $24,11 \pm 16,00$ mm con respecto a las pacientes con una carga menor o igual a 15000 copias quienes tuvieron una media de $16,95 \pm 11,64$ mm de Tamaño histológico total (p0,000) (Gráfico 29).

Gráfico 29: Tamaño histológico total y carga tumoral total punto de corte de 15000 copias (**p0,000**).



Tamaño histológico (mm)			
copias	N	Media	± D.E
≤ 15000	352	16,95	11,641
>15000	55	24,11	16,004
p0,000			

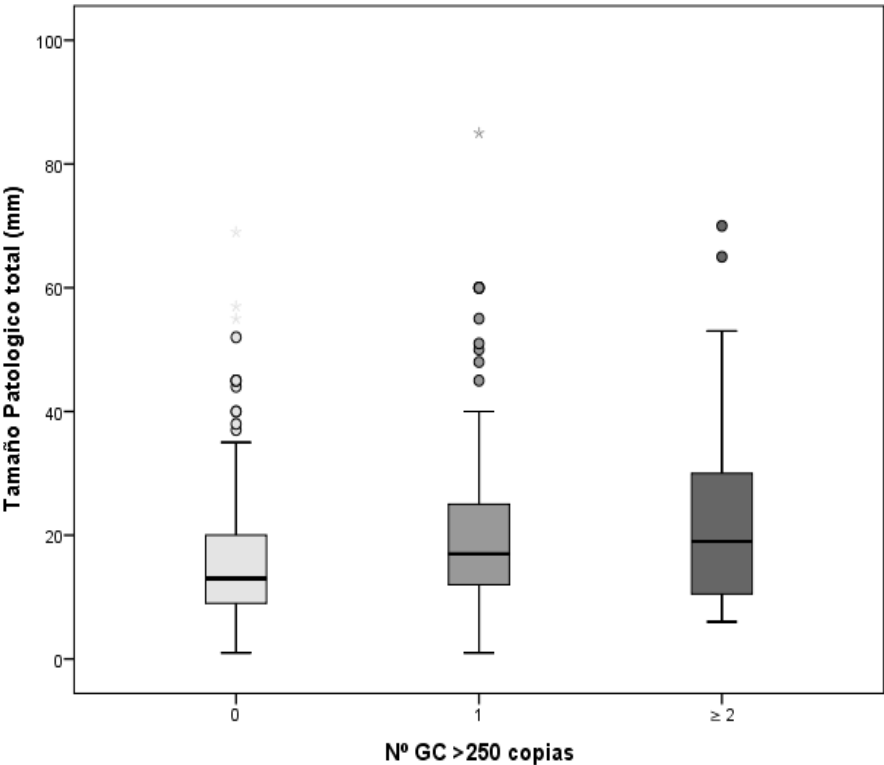
- Tamaño histológico total y distribución de carga tumoral.

Se observó una relación estadísticamente significativa en todos los análisis de este grupo, tanto para carga tumoral promedio como para la frecuencia de ganglios positivos. Mientras mayor Tamaño histológico total del tumor mayor carga tumoral promedio con un Coeficiente de Correlación de Pearson de 0,249 (p0,001).

Se observó que la media del Tamaño histológico total aumenta mientras mayor frecuencia de GC >250 copias. Para las pacientes con un GC >250, la media del Tamaño histológico total fue 20,85 ± 14,49 mm (Gráfico 30). Para las pacientes con dos o más GC >250, la media del tamaño foco mayor fue 24,42 ± 17,72mm (p0,000).

Al establecer el punto de corte para frecuencia de ganglios positivos > 5000 copias, se observó nuevamente que para las pacientes de los grupos con un GC >5000 y con dos o más con un GC >5000 la media de Tamaño histológico total fue mayor. Para las pacientes con un ganglio GC >5000 la media del Tamaño histológico total fue $25,40 \pm 16,79$ mm. Para las pacientes con dos o más GC >5000 la media del Tamaño histológico total fue $25,25 \pm 16,61$ mm ($p0,000$).

Gráfico 30: Tamaño histológico total y frecuencia de ganglios positivos > 250 ($p0,000$)



Tamaño (mm)			
Nº GC +	N	Media	± D.E
0	255	15,73	10,05
1	121	20,85	14,49
≥ 2	31	24,42	17,72

$p0,000$

2.3.3. Tamaño foco mayor y carga tumoral OSNA.

- Tamaño foco mayor y carga tumoral del GC principal

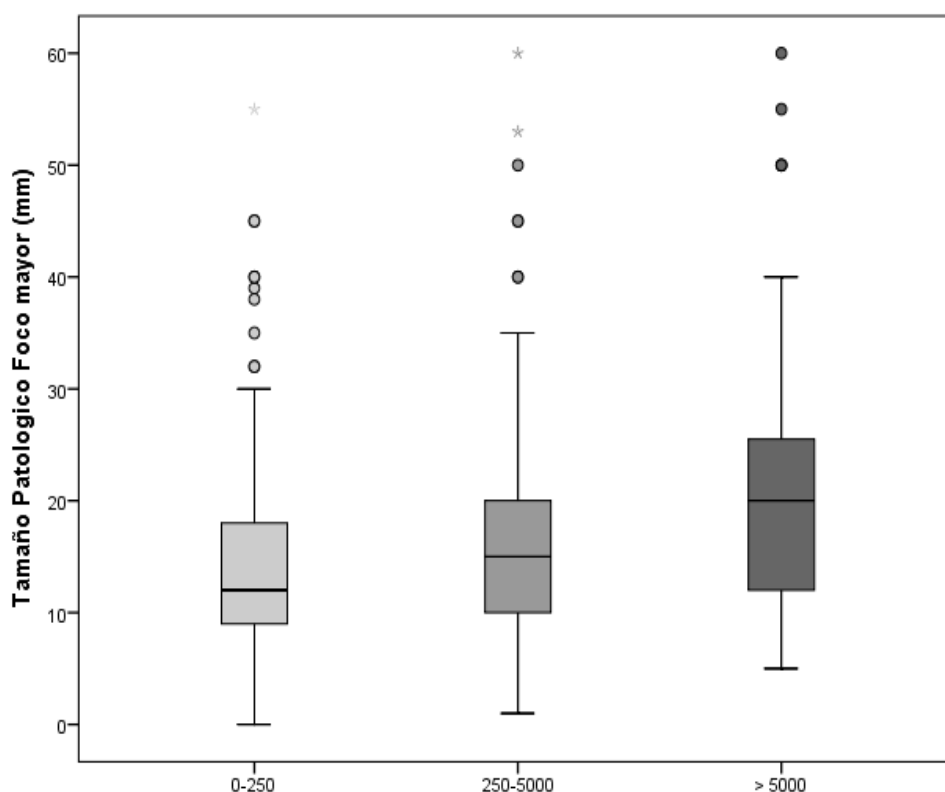
Se encontró una relación estadísticamente significativa entre el tamaño del foco mayor y las exploraciones de la carga tumoral del GC principal. Mientras mayor era el tamaño del foco mayor era la carga tumoral del GC principal, con un coeficiente de correlación de Pearson 0,811 y $p=0,012$.

Las pacientes con carga tumoral del GC principal >250 copias mostraron una media de tamaño de foco mayor de $19,73 \pm 13,61$ mm, mayor al de las pacientes con carga tumoral del GC principal de 0-250 copias, que tuvieron una media de tamaño de foco mayor de $14,48 \pm 8,25$ mm ($p=0,000$).

Las pacientes con carga tumoral del GC principal con >5000 copias o macrometástasis tienen mayor media de tamaño del foco mayor $22,61 \pm 14,99$ mm (Gráfico 31), seguidas por las pacientes con micrometástasis $>250-5000$ copias de carga tumoral del GC principal con $17,23 \pm 11,84$ mm de media del tamaño del foco mayor. Mientras que las pacientes con carga tumoral del GC principal 0-250 o negativos, presentaron la menor media $14,48 \pm 8,25$ mm de tamaño del foco mayor ($p=0,000$).

Igualmente que el grupo anterior se observó como la media del tamaño del foco mayor fue de $21,89 \pm 14,54$ mm; para las pacientes con carga tumoral del GC principal mayor de 7700 copias. Mientras que la media del tamaño del foco mayor fue de $15,45 \pm 9,76$ mm; para el grupo de carga tumoral del GC principal menor de 7700 copias, $p=0,000$.

Gráfico 31: Tamaño foco mayor y carga tumoral del GC principal punto de corte de 5000 copias (**p0,000**)



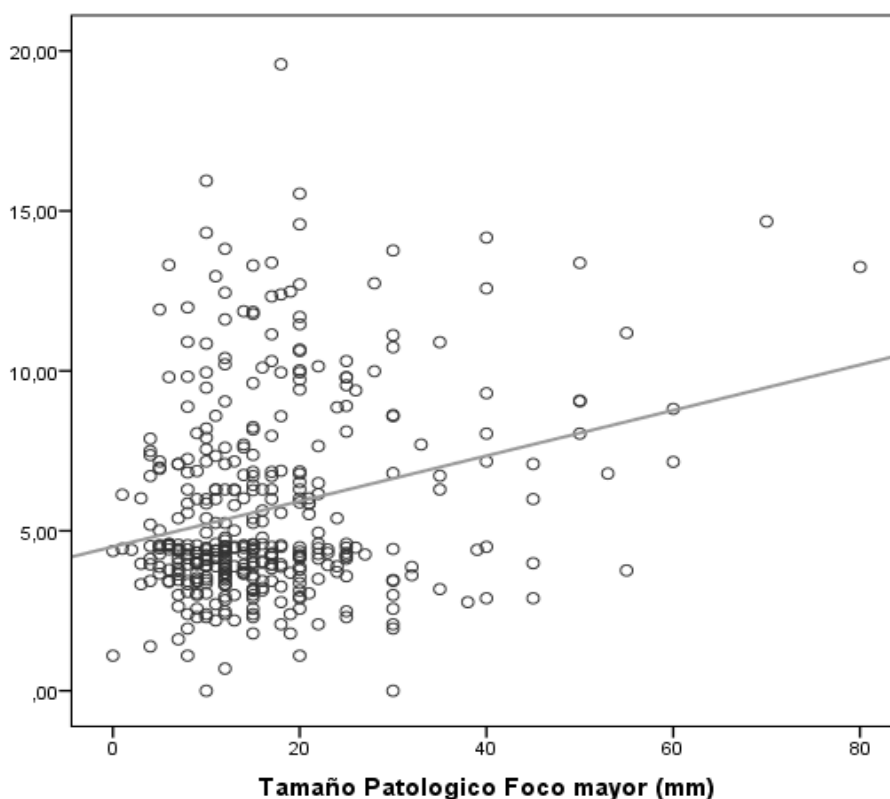
copias Máxima	Tamaño (mm)		
	N	Media	± D.E
0-250	254	15,71	10,06
250-5000	82	18,29	12,99
> 5000	71	25,37	16,63

p0,000

- Tamaño foco mayor y carga tumoral total

En este grupo también todas las asociaciones fueron estadísticamente significativas. Se observó que a mayor tamaño del foco mayor carga tumoral total, con un cociente de correlación de Pearson de 0,251 y p0,000 (Gráfico 32). Utilizando 15000 copias como punto de corte de carga tumoral total, la media de tamaño del foco mayor para las pacientes con más de 15000 copias fue de $21,47 \pm 14,70$ mm, mientras que para las paciente con carga menor o igual a 15000 copias, la media del tamaño del foco mayor fue menor $15,66 \pm 9,94$ mm (p0,000).

Gráfico 32: Tamaño foco mayor y carga tumoral total (**p0,000**)



- Tamaño foco mayor y distribución de carga tumoral

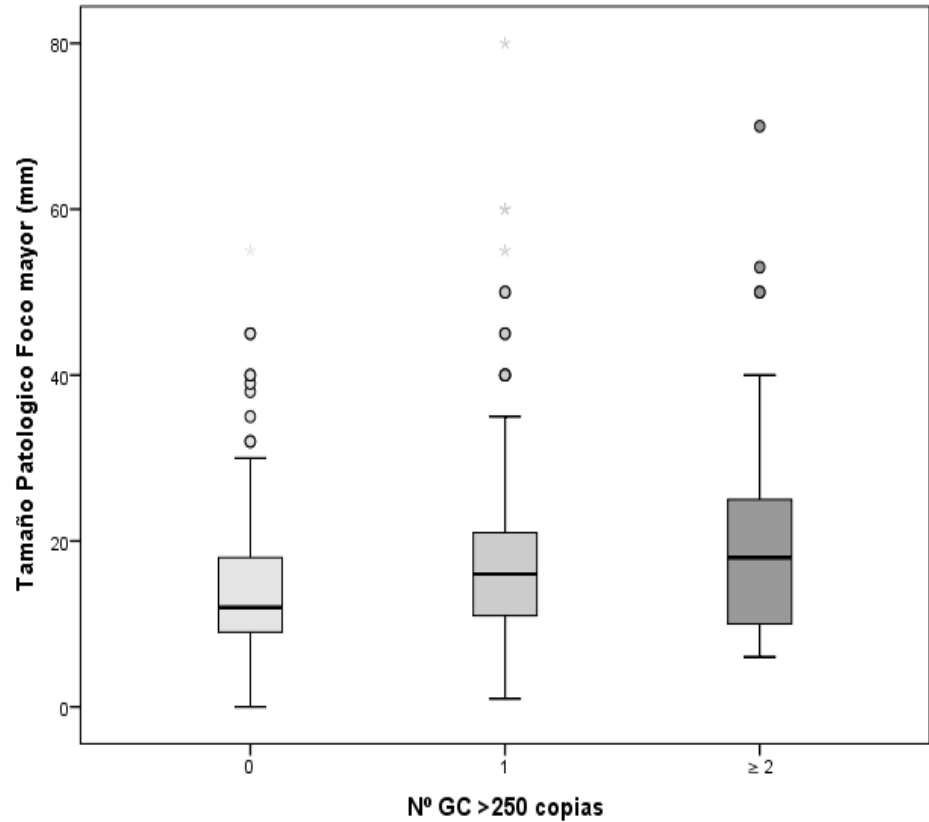
Nuevamente Se observó que todas las asociaciones fueron estadísticamente significativas entre el tamaño foco mayor y distribución de carga tumoral. Se encontró que mientras mayor tamaño del foco, mayor era la carga tumoral promedio, con un coeficiente de correlación de pearson de 0,229 y $p0,003$.

Cuando utilizamos 250 copias para punto de corte de frecuencia de ganglios positivos, se observó que la media del tamaño del foco mayor aumenta mientras mayor cantidad de ganglios positivos (Gráfico 33). Para las pacientes sin ganglios positivos la media del tamaño foco mayor fue de $14,50 \pm 8,24\text{mm}$. Para las pacientes con un ganglio positivo (>250) la media del tamaño foco mayor fue $19,21 \pm 13,06\text{ mm}$. Para las pacientes con dos o más ganglios positivos (>250) la media del tamaño foco mayor fue $21,71 \pm 15,87\text{mm}$ ($p0,000$).

Utilizando 5000 copias como punto de corte, se observó que la media del tamaño del foco mayor aumenta mientras mayor frecuencia de ganglios positivos. Para las pacientes sin ganglios positivos la media del tamaño foco mayor fue de $15,14 \pm$

9,31mm. Para las pacientes con un ganglio positivo (>5000) la media del tamaño foco mayor fue $22,73 \pm 14,76$ mm. Para las pacientes con dos o más ganglios positivos (>5000) la media del tamaño foco mayor fue $22,19 \pm 16,23$ mm, $p0,000$.

Gráfico 33: Tamaño foco mayor y frecuencia de GC positivos > 250 (**p0,000**)



Tamaño (mm)			
NºGC +	N	Media	± D.E.
0	257	14,50	8,24
1	121	19,21	13,06
≥2	31	21,71	15,87
p0,000			

2.3.4. Número de Focos AP y carga tumoral OSNA.

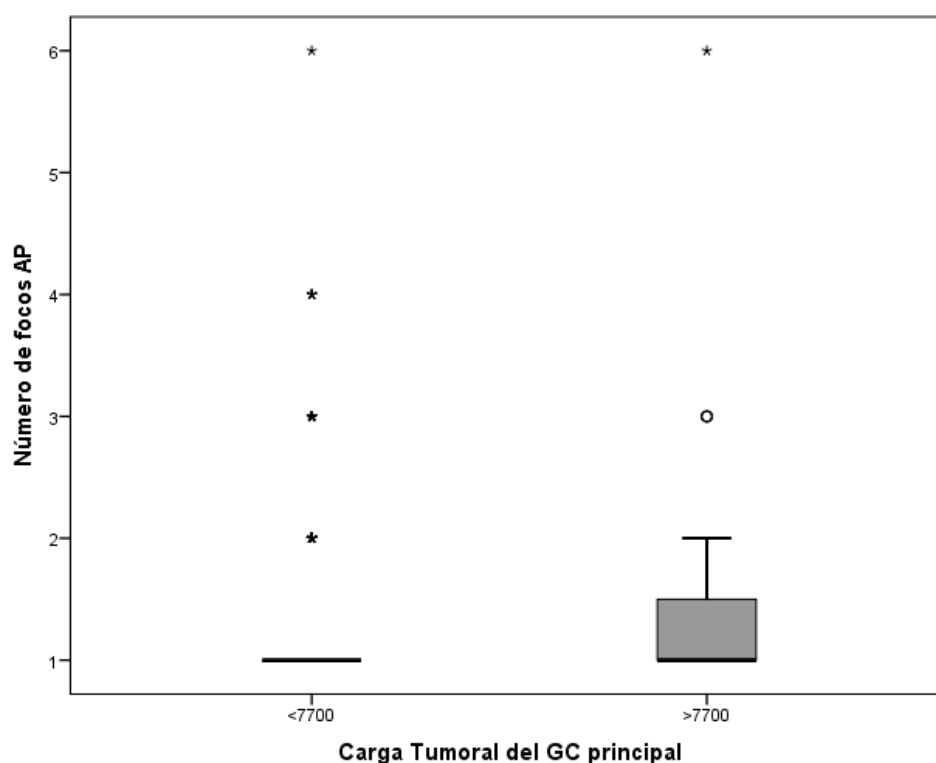
- Número de Focos AP y carga tumoral del GC principal.

En este análisis se ha evidenciado la relación estadísticamente significativa entre el número de focos AP y el punto de corte de 7700 copias, en el resto de exploraciones los resultados no fueron estadísticamente significativos.

Aunque se observó una relación directamente proporcional entre el número de focos AP con la carga tumoral del GC principal y un coeficiente de Correlación de Pearson 0,097, la relación fue al límite de la significación ($p0,050$).

Con los puntos de corte de 250 y 5000 copias no se encontró relación estadísticamente significativa. A diferencia de con el corte de 7700 copias que la relación fue estadísticamente significativa (Gráfico 34). Las pacientes que tuvieron una carga tumoral del GC principal por encima de 7700 copias presentaron una media de $1,37 \pm 0,81$ focos de AP, ligeramente mayor que la media de las pacientes con una carga tumoral del GC principal menor o igual a 7700 copias que fue de $1,16 \pm 0,55$ de focos AP ($p0,012$).

Gráfico 34: Número de Focos AP y carga tumoral del GC principal punto de corte de 7700 (**p0,012**)

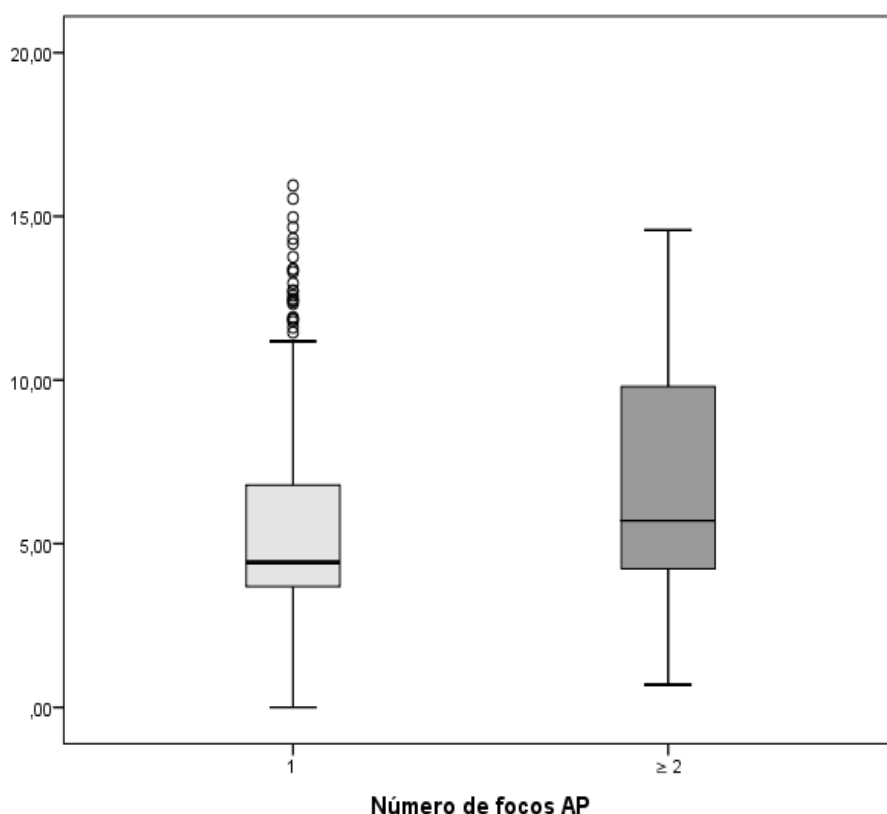


		Nº Focos	
copias	N	Media	± D.E.
≤ 7700	344	1,16	0,55
>7700	63	1,37	0,81

p0,012

- Número de focos AP y carga tumoral total

En este grupo de variables todas las asociaciones fueron estadísticamente significativas. A mayor número de focos mayor carga tumoral con un Coeficiente de correlación de Pearson 0,100 y p0,045. También se observa que la media de focos AP es mayor en aquellas pacientes con carga tumoral total mayor a 15000 copias, de 1,35 ± 0,82 de número de focos AP, mientras que para las pacientes carga tumoral total menor de 15000 copias, la media de números de focos AP fue menor de 1,16 ± 0,56 (p0,039).



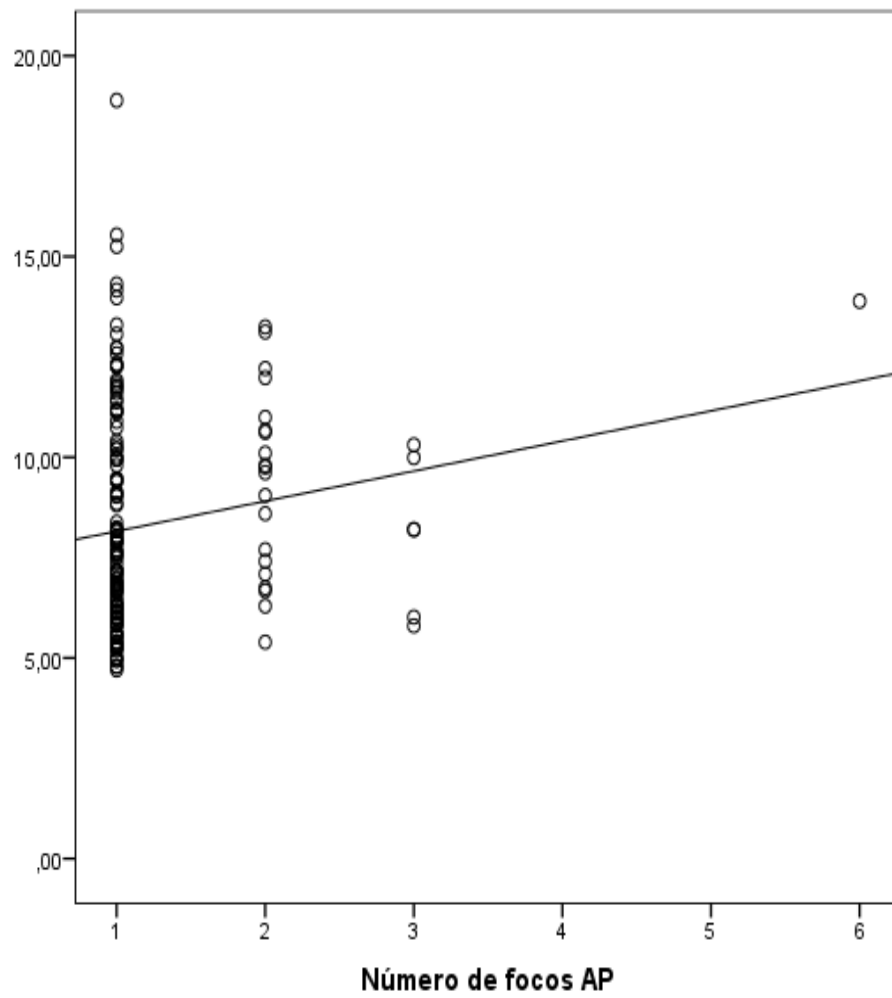
- Número de Focos AP y distribución de carga tumoral

Se observó una relación estadísticamente significativa entre el número de focos AP con la carga tumoral promedio y con la frecuencia de GC positivos utilizando el punto de corte de 5000 copias, porque con el punto de corte de 250 copias la diferencia no fue estadísticamente significativa.

Mientras mayor número de focos AP Se observó mayor carga tumoral promedio, con un coeficiente de correlación de Pearson de 0,166 y $p0,031$ (Gráfico 35).

Se observó que mientras mayor frecuencia de ganglios positivos > 5000copias, mayor era la media de número de focos AP. Para las pacientes con un GC > 5000copias la media fue $1,27 \pm 0,56$ focos AP. Para las pacientes con dos o más GC > 5000copias la media fue $1,56 \pm 1,26$ focos AP, $p0,004$. Con el punto de corte >250 copias para frecuencia de ganglios positivos, las pacientes con un GC >250 copias la media fue $1,20 \pm 0,49$ focos AP. Para las pacientes con dos o más GC >250 copias, la media fue $1,39 \pm 0,99$ focos AP, pero esta relación fue al límite de la significación estadística $p0,050$.

Gráfico 35: Número de Focos AP y carga tumoral promedio ($p0,031$).



2.3.5. Tipo histológico y carga tumoral OSNA.

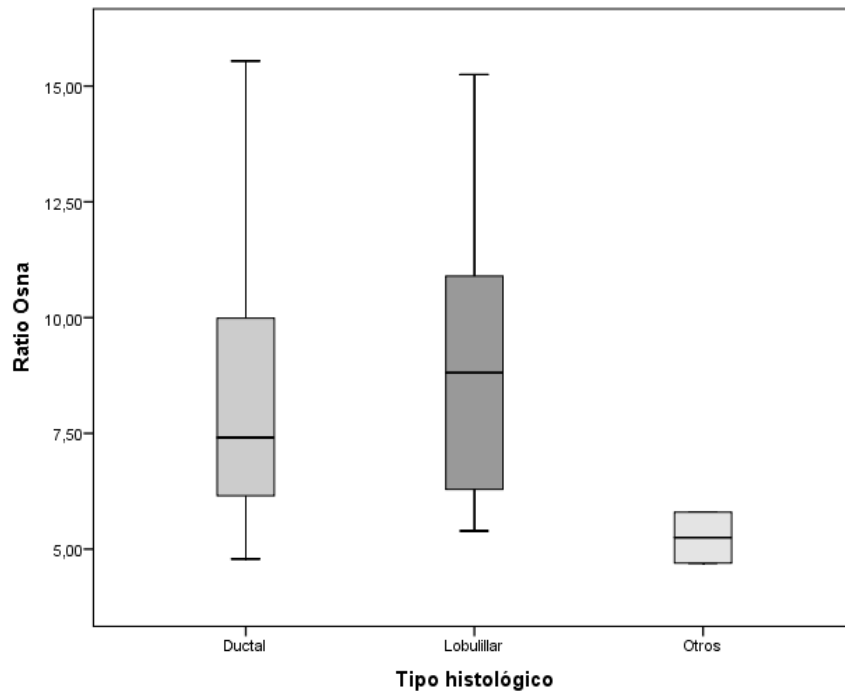
- Tipo histológico y carga tumoral del GC principal: No se encontró relación estadísticamente significativa.
- Tipo histológico y carga tumoral total: No se encontró relación estadísticamente significativa.
- Tipo histológico y distribución de carga tumoral

Se encontró relación estadísticamente significativa entre el tipo histológico y distribución de carga tumoral tanto para la carga tumoral promedio como para la frecuencia de ganglios positivos con un punto de corte de 5000 copias, con el punto de corte de 250 copias no se ha encontrado significación estadística.

Los tumores de tipo histológico Lobulillar tenían mayor media de carga tumoral promedio $9,18 \pm 2,87$, que los tumores ductales con $8,20 \pm 2,65$ de media (Gráfico 36). El resto de tipos histológicos tumorales tenían una media menor de $5,25 \pm 0,78$ de carga tumoral promedio ($p0,025$).

Los tumores de tipo histológico Lobulillar presentaron un porcentaje mayor frecuencia de ganglios positivos con > 5000 copias (Gráfico 37). Un 25,4% de casos con un GC > 5000 copias, y un 5,1% de casos con ≥ 2 GC > 5000 copias. Los tumores de tipo Ductal un 11,6% de casos con un GC > 5000 copias y un 4,1% de casos con dos o más ganglios positivos. Los otros tipos histológicos no mostraron ningún caso de GC > 5000 copias ($p0,032$).

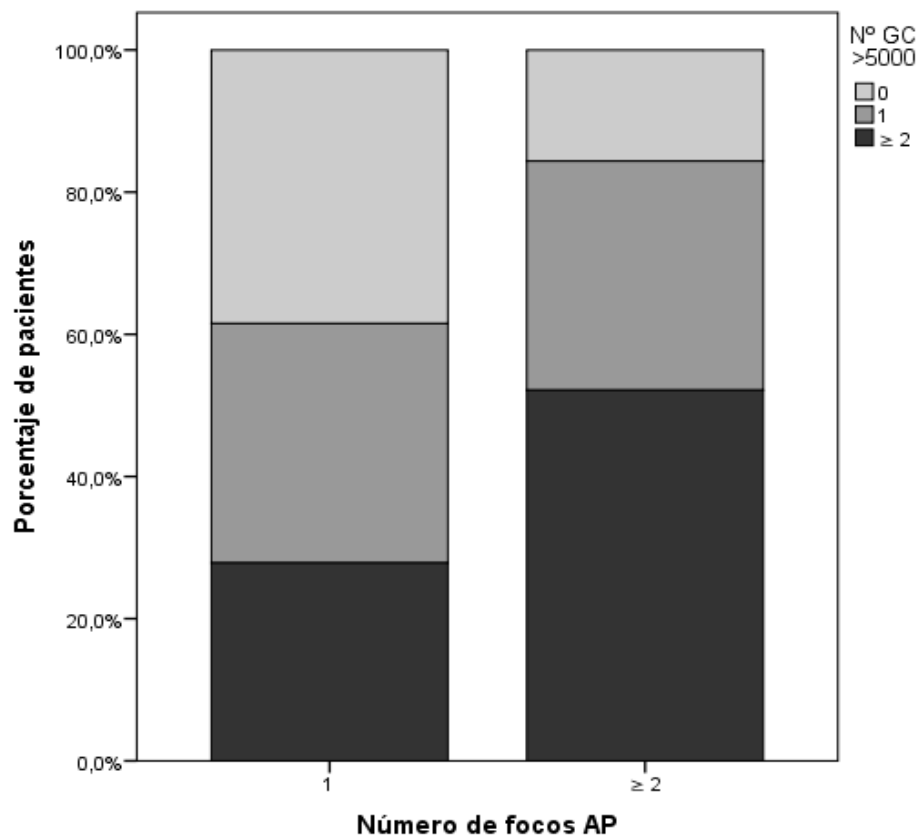
Gráfico 36: Tipo Histológico y carga tumoral promedio (**p0,025**)



Tipo Histológico	N	Media	± D.E.
Ductal	139	8,20	2,65
Lobulillar	29	9,18	2,87
Otros	2	5,25	0,78

p0,025

Gráfico 37: Tipo Histológico y frecuencia de GC > 5000 copias (**p0,032**)



2.3.5. Grado Histológico y carga tumoral OSNA.

1. Grado histológico y carga tumoral del GC principal

La carga tumoral de GC principal y los puntos de corte 250, 5000 y 7700 mostraron relación estadísticamente significativa con el grado histológico. Las pacientes con tumores grado II tienen mayor media de carga tumoral del GC principal ($5,98 \pm 3,28$ copias), seguidamente por las pacientes con tumores grado III con una media de $5,69 \pm 3,05$. La menor media de este grupo la obtuvieron las pacientes con tumores grado I una media de $5,06 \pm 2,30$ de carga tumoral del GC principal ($p0,043$) (Gráfico 38).

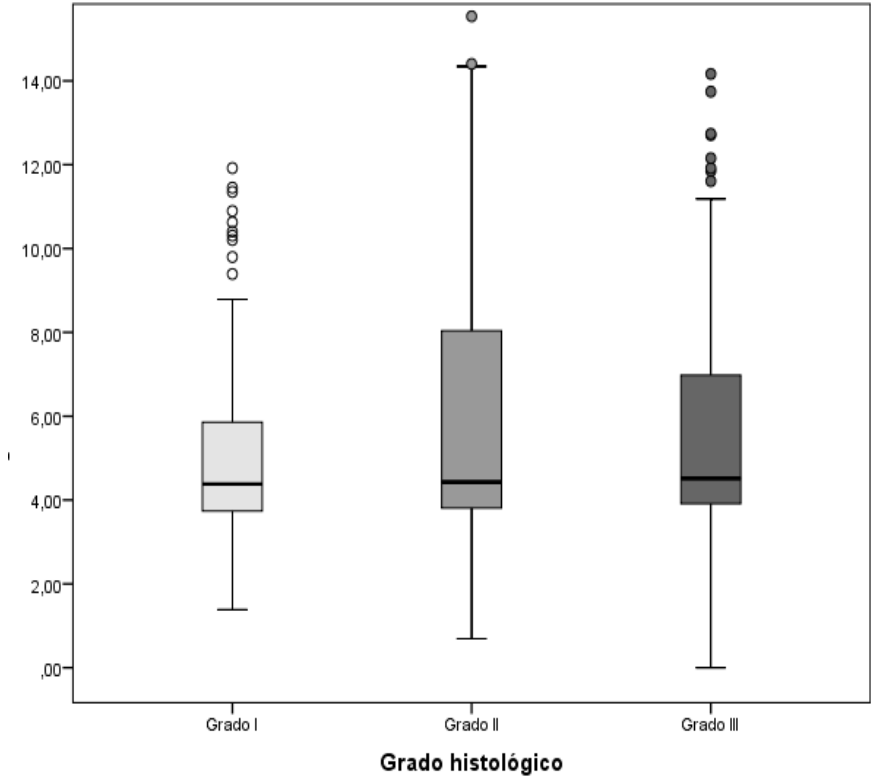
Se observó que los tumores grado III y grado II tenían mayor porcentaje de carga tumoral del GC principal >250 copias. El porcentaje para los tumores Grado III fue de 41,4%, para el grado II un 40,7% el menor porcentaje para los tumores grado I un 26,6% ($p0,030$).

Utilizando el punto de corte de 5000 copias los tumores grado II mostraron un mayor porcentaje de casos con carga tumoral del GC principal >5000 y los tumores grado III mayor porcentaje de casos con carga tumoral del GC principal 250-5000 copias. Los tumores grado III mostraron, un 28,4% de casos con carga tumoral del GC principal entre 250-5000 copias y un 12,9% de >5000 copias. Los tumores Grado II un 16,7% de casos de carga tumoral del GC principal entre 250-5000 copias, menor que los grado III, y un 24,1% de carga tumoral del GC principal >5000 copias, mayor que los grado III. $p0,002$.

Al analizar el Grado Histológico tumoral con carga tumoral del GC principal por encima de 7700 copias, son las pacientes con tumores grado II las que tienen un mayor porcentaje de casos con carga tumoral del GC principal por encima de 7700 copias un 21,2%, mientras los tumores grado III un 12,1% y los grado I 9,2% de casos. Por el contrario cuando miramos el porcentaje de casos con una carga tumoral del GC principal de 7700 copias o menor son los tumores grado I los que mostraron mayor

porcentaje de casos un 90,8%, los tumores grado III un 87,9% y los tumores grado II un 79,0% de casos (p0,016).

Gráfico 38 Grado Histológico y carga tumoral del GC principal (p0,043)



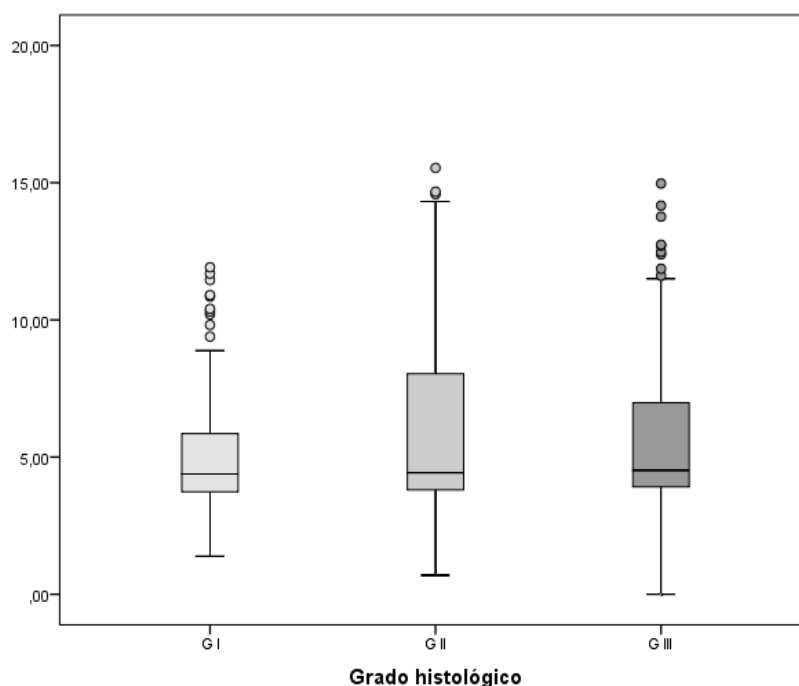
Grado	N	Media	± D.E
G I	109	5,06	2,30
G II	162	5,98	3,28
G III	116	5,69	3,05

p0,043

2. Grado histológico y carga tumoral total

La media de carga tumoral total fue mayor para los tumores grado II (6,01 ±3,33 copias) mientras que la media para los tumores grado III fue de 5,73 ± 3,10 copias y para los tumores Grado I 5,06 ± 2,32 copias, y esta relación fue estadísticamente significativa (p0,039) (Gráfico 39). Sin embargo con el punto de corte de 15000 copias no se encontró relación estadísticamente significativa.

Gráfico 39: Grado Histológico y carga tumoral total (**p0,039**).



	N	Media	± D.E.
G I	109	5,06	2,32
G II	162	6,01	3,33
G III	116	5,73	3,10

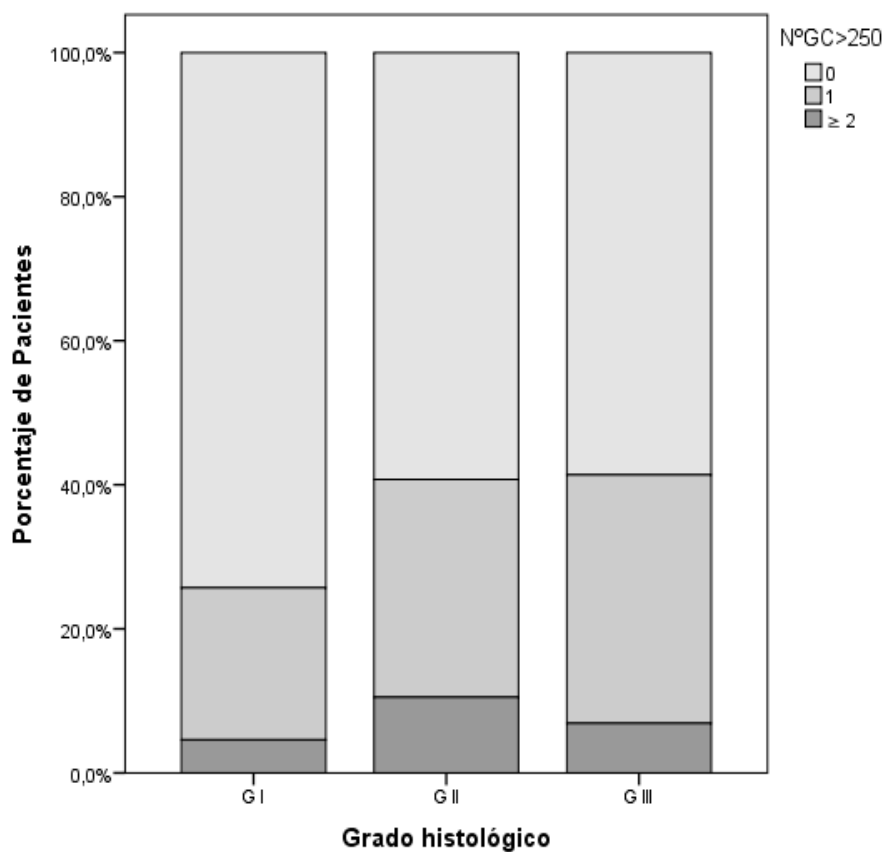
p0,039

3. Grado histológico y distribución de carga tumoral.

Con la carga tumoral promedio no se encontró relación estadísticamente significativa, por el contrario con frecuencia de ganglios positivos se encontró relación con los dos puntos de corte. Los tumores grado II y grado III tuvieron mayor porcentaje de pacientes con GC >250 copias (Gráfico 40). Las pacientes con tumores Grado I tuvieron un 74,3 % de casos con ningún GC >250 copias, un 21,1% de casos con un GC >250 copias y un 4,6% de casos con dos o más GC >250 copias. Las pacientes con tumores Grado II tuvieron un 59,3 % de casos con ningún GC >250 copias, un 30,2% de casos con un GC >250 copias y un 10,5% de casos con ≥ 2 GC >250 copias. Las pacientes con tumores Grado III tuvieron un 58,6 % de casos con ningún GC >250 copias, un 34,5% de casos con un GC >250 copias y un 6,9% de casos con ≥ 2 GC >250 copias (p0,047).

Al hacer el análisis con 5000 copias como punto de corte de frecuencia de ganglios positivos, fueron nuevamente los tumores grado II y grado III los que tuvieron mayor porcentaje de pacientes con GC >5000 copias, sin embargo los tumores Grado II tienen mayor porcentaje de GC >5000 que los tumores Grado II. Las pacientes con tumores Grado I tuvieron un 89,9 % de casos con ningún GC >5000, un 8,3% de casos con un GC >5000 y un 1,8% de casos con ≥ 2 GC >5000. Las pacientes con tumores Grado II tuvieron un 75,9 % de casos con ningún GC >5000, un 17,9% de casos con un GC >5000 y un 6,2% de casos con ≥ 2 GC >5000. Las pacientes con tumores Grado III tuvieron un 87,1 % de casos con ningún GC >5000, un 8,6% de casos con un GC >5000 y un 4,3% de casos con ≥ 2 GC >5000 ($p=0,022$).

Gráfico 40 Grado histológico y frecuencia de GC > 250 (**p0,047**).



		Nº GC > 250		
Grado		0	1	≥ 2
G I	N	81	23	5
	%	74,3%	21,1%	4,6%
G II	N	96	49	17
	%	59,3%	30,2%	10,5%
G III	N	68	40	8
	%	58,6%	34,5%	6,9%

p0,047

2.3.6. Infiltración de piel y carga tumoral OSNA.

4. Infiltración de piel y carga tumoral del GC principal

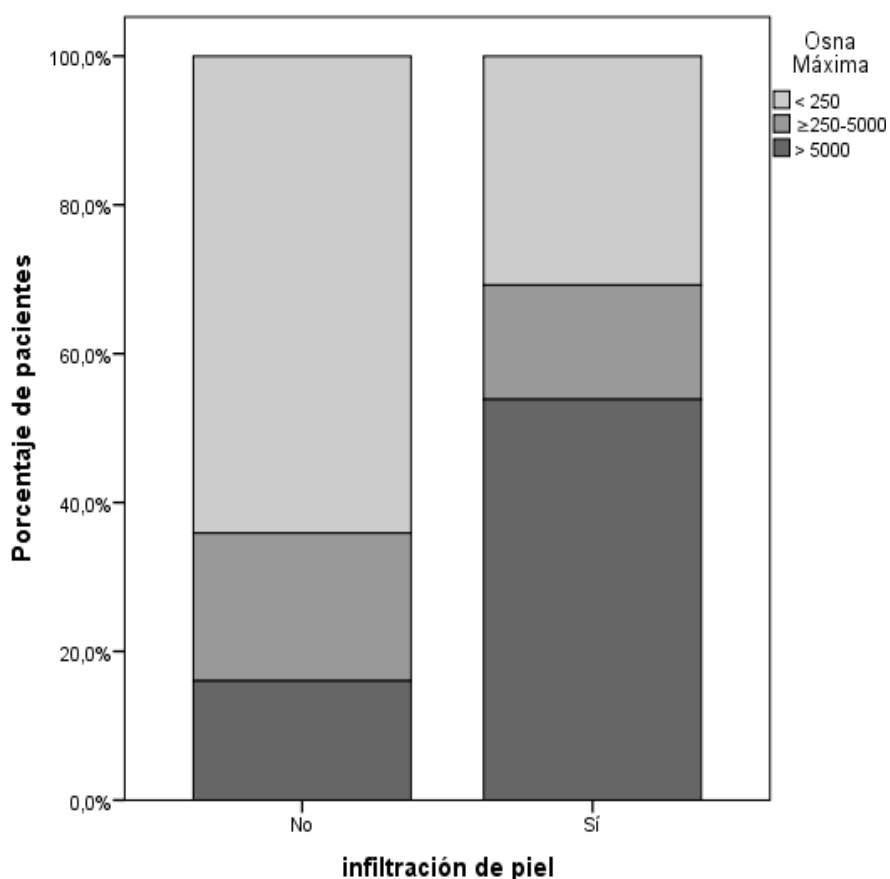
Se ha encontrado relación estadísticamente significativas en todas las exploraciones entre la infiltración de piel y carga tumoral del GC principal. Los tumores con infiltración de piel asociaron una mayor carga de carga tumoral del GC principal con una media de $9,14 \pm 4,28$ y los tumores sin infiltración de piel tuvieron una media menor de $5,52 \pm 2,92$ ($p0,001$).

Las pacientes con tumores que infiltran la piel tuvieron mayor porcentaje de casos con carga tumoral del GC principal >250 , un 69,2% mientras que, las pacientes con tumores que no infiltran la piel tuvieron un 35,9% de casos ($p0,019$).

En cuanto al punto de corte de 5000 copias, el mayor porcentaje de casos con carga tumoral del GC principal > 5000 copias lo tuvieron las pacientes con tumores con infiltración de piel un 53.8%, y un 15,4% de casos con carga tumoral del GC principal entre 250-5000. Las pacientes con tumores sin infiltración de piel mostraron un porcentaje de casos menor tanto para carga tumoral del GC principal >5000 como entre 250 y 5000 copias un 16,0% y un 19,8% de de casos respectivamente ($p0,002$) (Gráfico 41).

Con el punto de corte de 7700 copias nuevamente los tumores con infiltración de piel mostraron una mayor asociación con cifras de carga tumoral del GC principal mayor de 7700 copias. Los tumores con infiltración de piel un 53,8% de casos >7700 copias, frente a un 14,0% de casos para los tumores sin infiltración de piel. Así mismo cuando la carga tumoral del GC principal fue menor a 7700 copias un 86,0% de los tumores no tenían infiltración de piel y un 46,2% si tenían infiltración de piel ($p0,001$).

Gráfico 41: Infiltración de piel y carga tumoral del GC principal punto de corte de 5000 copias (**p0,002**).



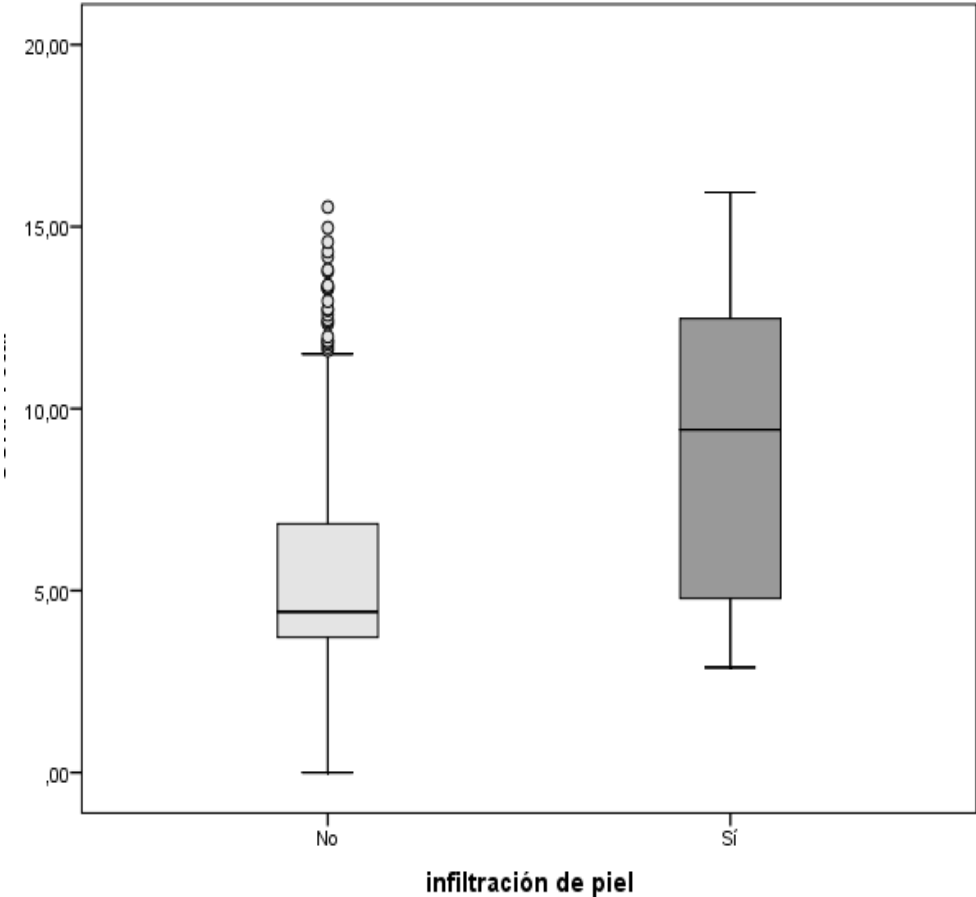
Infiltración de piel		Carga tumoral GC principal		
		< 250	≥250-5000	> 5000
No	N	252	78	63
	%	64,1%	19,8%	16,0%
Si	N	4	2	7
	%	30,8%	15,4%	53,8%
p0,002				

5. Infiltración de piel y carga tumoral total

Se ha encontrado diferencia estadísticamente significativa entre la infiltración de piel y la carga tumoral total y también con el punto de corte de 15000 copias. Las pacientes con tumores que infiltran la piel tenían una media carga tumoral total de $9,20 \pm 4,34$ copias, mayor que las pacientes con tumores que no infiltran la piel, que tuvieron una media de $5,55 \pm 2,96$ de carga tumoral total ($p0,001$) (Gráfico 42).

Los tumores con infiltración de piel tenían un 46,2% de pacientes con más de 15000 de copias carga tumoral total. Mientras que el porcentaje de pacientes con más de 15000 copias era menor, un 12,5%, cuando el tumor no tenía infiltración linfovascular (p0,004).

Gráfico 42: Infiltración de piel y carga tumoral total (p0,001)



Infiltración de piel	N	Media	± D.E
No	392	5,55	2,96
Sí	13	9,20	4,34

p0,001

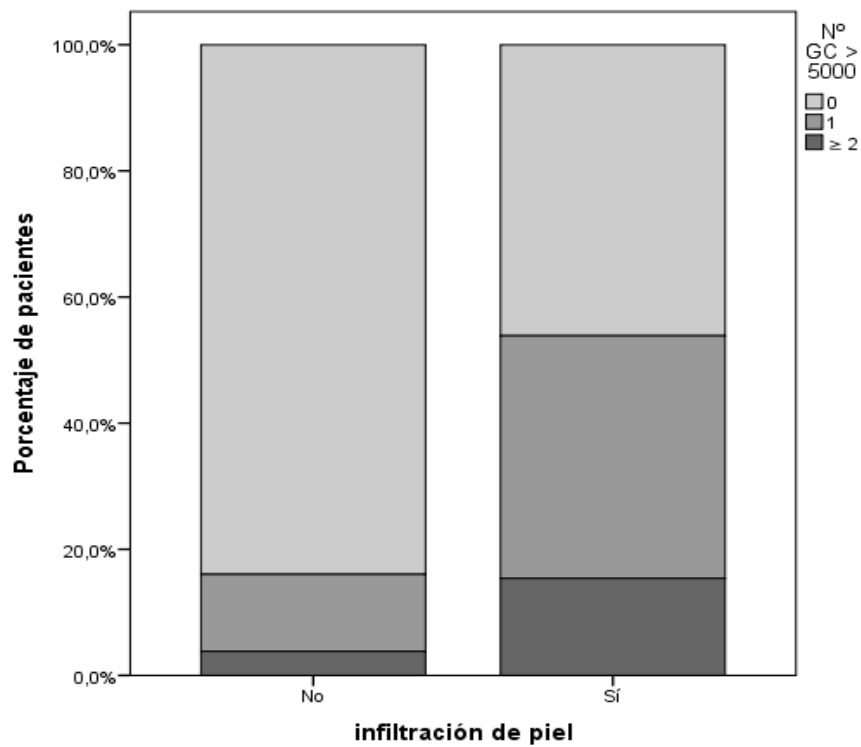
6. Infiltración de piel y distribución de carga tumoral.

Mientras que con la carga tumoral promedio no se observó asociación estadísticamente significativa, con la frecuencia de ganglios positivos si se ha encontrado resultados estadísticamente significativos tanto con el punto de corte de 250 copias como con el de 5000 copias.

Cuando se estableció el punto de corte de carga tumoral en más de 250 copias para la frecuencia de ganglios positivos, las pacientes con tumores con infiltración de piel tuvieron mayor porcentaje de casos de ganglios con > 250 copias. En aquellos tumores que tenían infiltración de piel se observó un 30,8% de casos con ningún GC >250 copias, un 46,2% de casos con un GC >250 copias y un 23,1% de casos con ≥ 2 GC >250 copias. En los tumores sin infiltración de piel se observó un 64,4% de casos con ningún GC >250 copias, un 28,8% de casos con un GC >250 copias y un 7,4% de casos con ≥ 2 GC >250 copias. Sin embargo en el análisis estadístico el porcentaje de celdas con pocos casos es alto un 33,3% ($p=0,023$).

Con el punto de corte de 5000 copias, los tumores con infiltración de piel tuvieron mayor porcentaje de casos (Gráfico 43). Cuando el tumor tenía infiltración de piel hubo un 46,2% de casos con ningún GC > 5000, un 38,5% de casos con un GC > 5000 y un 15,4% de casos con ≥ 2 GC > 5000. Cuando el tumor no mostraba infiltración de piel los porcentajes eran los siguientes, un 84,0% de casos con ningún GC > 5000, un 12,2% de casos con un GC > 5000 y un 3,8% de casos con ≥ 2 GC > 5000 ($p=0,002$).

Gráfico 43: Infiltración de piel y frecuencia de GC > 5000 (**p0,002**).



Infiltración de piel		NºGC + > 5000		
		0	1	≥ 2
No	N	330	48	15
	%	84,0%	12,2%	3,8%
Si	N	6	5	2
	%	46,2%	38,5%	15,4%

p0,002

2.3.6. Infiltración linfovascular y carga tumoral OSNA.

7. Infiltración linfovascular y carga tumoral del GC principal.

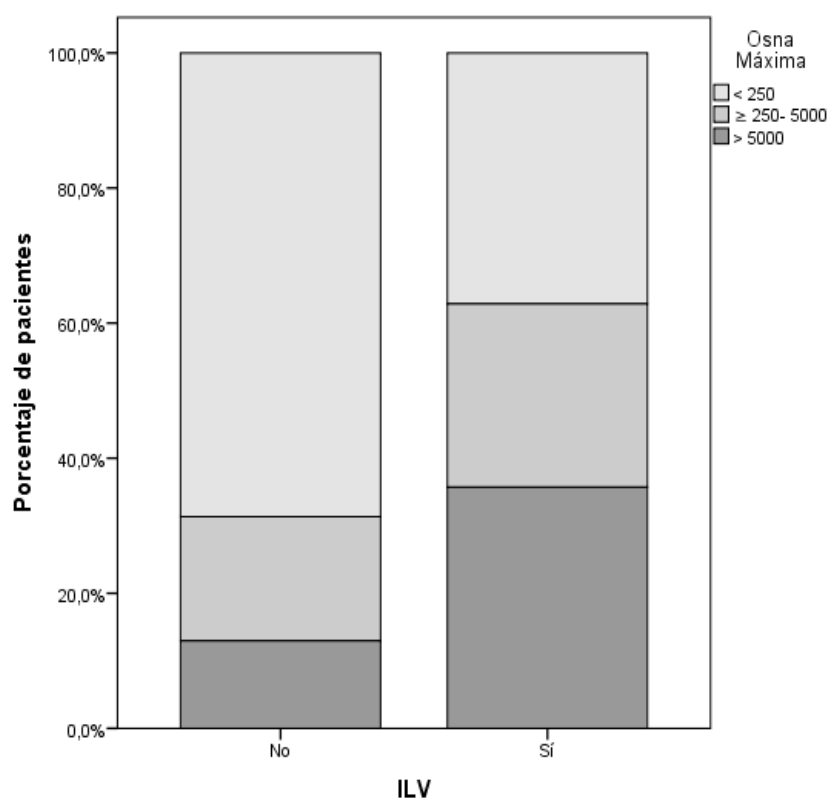
Se observó relación estadísticamente significativa en todos los análisis de este grupo. En los tumores con infiltración linfovascular la media de carga tumoral del GC principal fue $7,37 \pm 3,36$, mayor que la media de las pacientes sin infiltración linfovascular tumoral, que fue de $5,25 \pm 2,80$ ($p0,000$).

Las pacientes con tumores que tienen infiltración linfovascular, mostraron un mayor porcentaje de casos con carga tumoral del GC principal >250 , un 62,9%. Mientras que por el contrario cuando los tumores no tienen infiltración linfovascular tuvieron un 31,3% de casos con carga tumoral del GC principal >250 , $p0,000$.

En cuanto al punto de corte de 5000 copias, el porcentaje de casos con carga tumoral del GC principal >5000 fue de 35,7% para los tumores con infiltración linfovascular y de 13,0% para los tumores sin ILV. El porcentaje de casos con carga tumoral del GC principal entre 250-5000 copias fue de 27,1% para los tumores con ILV y de 18,4% para los tumores sin ILV ($p0,000$) (Gráfico 44).

Los tumores con infiltración linfovascular tuvieron un mayor porcentaje de carga tumoral carga tumoral del GC principal mayor de 7700 copias un 32,9%. En comparación se observó un 67,1% de casos con carga tumoral del GC principal menor o igual a 7700 copias. Mientras que las pacientes con tumores sin infiltración linfovascular tuvieron un porcentaje de 11,1 % de casos con carga tumoral del GC principal >7700 copias y un 88,8% de casos con <7700 copias ($p0,000$).

Gráfico 44: Infiltración linfovascular y carga tumoral del GC principal punto de corte de 5000 copias (**p0,000**).



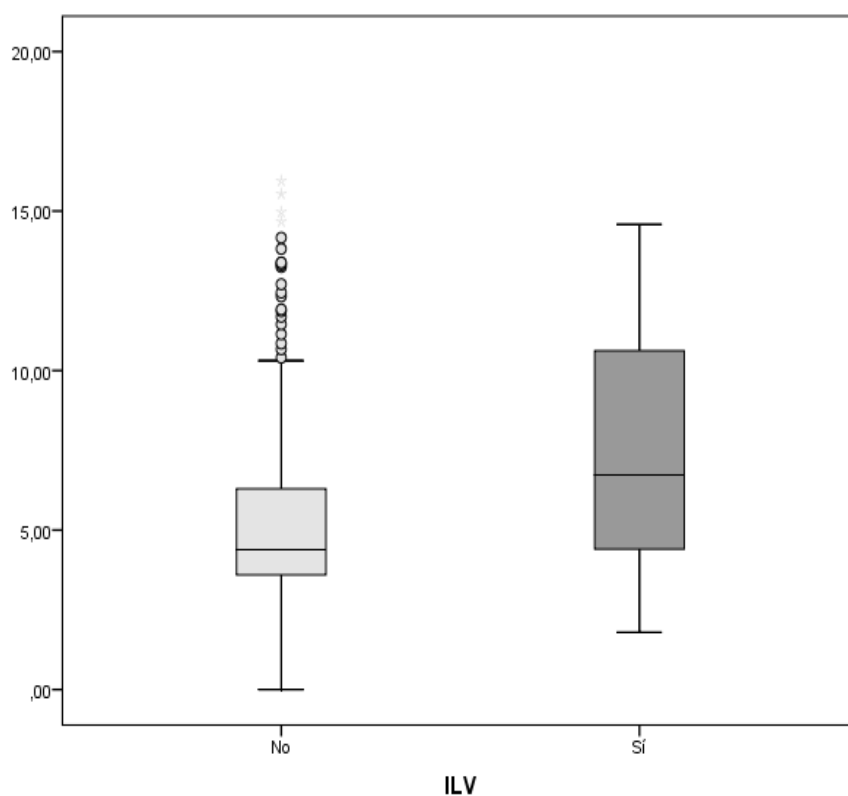
ILV		< 250	≥ 250-5000	> 5000
No	N	228	61	43
	%	68,7%	18,4%	13,0%
Sí	N	26	19	25
	%	37,1%	27,1%	35,7%

p0,000

8. Infiltración linfovascular y carga tumoral total

En este grupo también resultaron estadísticamente significativas todas las asociaciones. Los tumores ILV mostraron una media de carga tumoral total de $7,41 \pm 3,39$ mientras los tumores sin infiltración linfovascular mostraron una media menor de carga tumoral total $5,27 \pm 2,85$ copias ($p0,000$). De total de tumores con infiltración linfovascular, un 31,4%, presentaban una carga tumoral total mayor de 15000 copias, mientras que los tumores sin infiltración linfovascular tenían un porcentaje menor de casos con más de 15000 copias un 9,7 % ($p0,000$).

Gráfico 45: Infiltración linfovascular y carga tumoral total (**p0,000**).



ILV	N	Media	± D.E
No	331	5,27	2,85
Sí	70	7,41	3,39

p0,000

9. Infiltración linfovascular y distribución de carga tumoral.

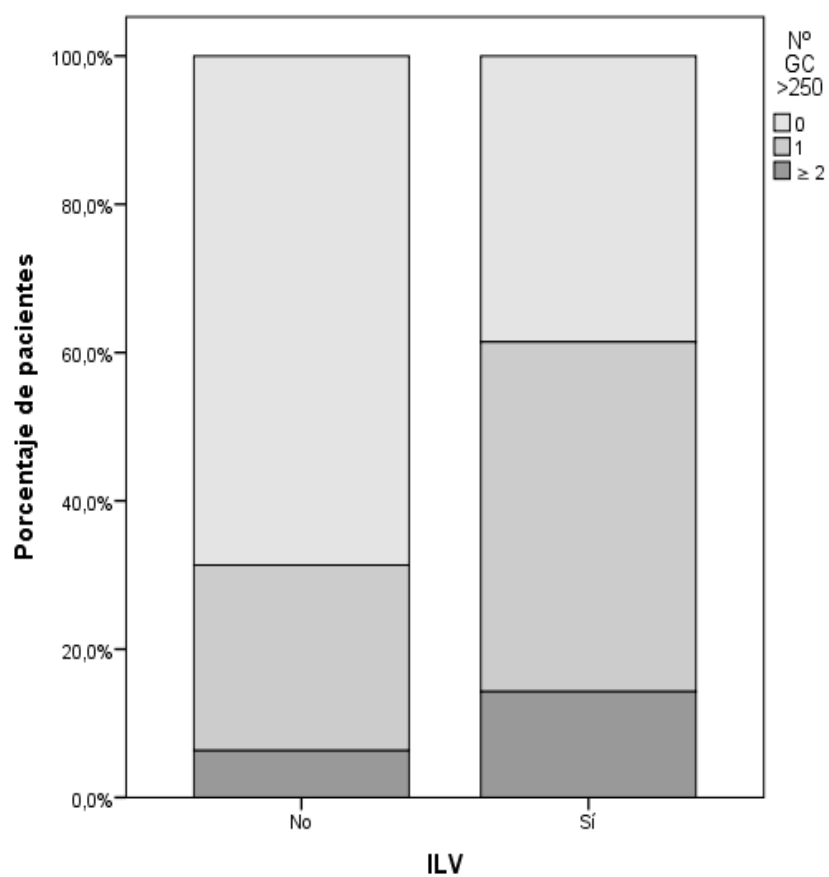
No se encontró relación estadísticamente significativa con la carga tumoral promedio, mientras que con los puntos de corte de frecuencia de ganglios positivos todas las asociaciones fueron estadísticamente significativas.

Las pacientes con infiltración linfovascular tumoral tuvieron mayor porcentaje de GC > 250. Cuando la infiltración linfovascular estaba presente hubo un 38,6% de casos con ningún GC > 250, un 47,1% de casos con un GC > 250 y un 14,3% de casos con ≥2 GC > 250s. Cuando el tumor no tenía infiltración linfovascular los porcentajes

eran los siguientes, un 68,7% de casos con ningún GC > 250, un 25,0% de casos con un GC > 250 y un 6,3% de casos con ≥ 2 GC > 250 ($p0,000$) (Gráfico 46).

Analizando el punto de corte de carga tumoral de más de 5000 copias en el ganglio centinela, las pacientes con infiltración linfovascular tumoral tuvieron mayor porcentaje de casos. En aquellos tumores que tenían infiltración linfovascular se observó un 64,3% de casos con ningún GC > 5000, un 25,7% de casos con un GC > 5000 y un 10,0% de casos con ≥ 2 GC > 5000. En los tumores sin infiltración linfovascular se observó un 87,0% de casos con ningún GC > 5000, un 9,9% de casos con un GC > 5000 y un 3,0% de casos con ≥ 2 GC > 5000 ($p0,000$).

Gráfico 46: Infiltración linfovascular y frecuencia de GC > 250 copias (**p0,000**).



ILV		Nº GC >250		
		0	1	≥ 2
No	N	228	83	21
	%	68,7%	25,0%	6,3%
Sí	N	27	33	10
	%	38,6%	47,1%	14,3%
		p0,000		

2.4. Estudio univariante entre las variables moleculares y la carga tumoral OSNA

Como podemos observar en la Tabla 22, en este grupo de las características moleculares no se ha encontrado ninguna relación estadística con las variables dependientes.

Tabla 22 Estudio univariante entre las variables moleculares y la carga tumoral OSNA

Carga tumoral OSNA	Moleculares							Subtipo
	RE	RE %	RP	RP %	Her2	Ki67	Ki67 20%	p53
Carga Tumoral del GC principal								
Carga Tumoral del GC principal								
250								
5000								
7700								
Carga tumoral total								
Carga tumoral total								
15000								
Distribución de carga tumoral								
Carga tumoral Promedio								
Frecuencia GC positivos								
> 250								
> 5000								
> 7700								

Recuadros Grises: Relación significativa $p < 0,05$

Recuadros Blancos: Relación No significativa

3. Estudio multivariante

El estudio multivariante demostró que las únicas variables con efecto independiente fueron el tamaño patológico total e ILV (infiltración linfovascular). Esto se observó tanto para la variable respuesta carga tumoral del ganglio principal y carga tumoral total. Como se puede ver en la Tabla 23 y en la Tabla 24, los resultados son muy similares para las dos variables respuesta.

Tabla 23: Estudio Multivariante entre las variables tamaño patológico total e ILV con la carga tumoral del ganglio principal.

Carga tumoral del ganglio principal			
Variable	β	ES β	p
Tamaño patológico total	0,068	0,14	< 0,001
ILV	1,586	0,436	< 0,001
Constante	4,238	0,292	< 0,001
R ² 0,143			

Tabla 24: Estudio Multivariante de las variables tamaño patológico total e ILV con la carga tumoral total.

Carga tumoral total			
Variable	β	ES β	p
Tamaño patológico total	0,069	0,14	< 0,001
ILV	1,580	0,443	< 0,001
Constante	4,245	0,296	< 0,001
R ² 0,142			

Aunque queda demostrada una asociación independiente la capacidad predictiva de tamaño patológico total e ILV, sobre la Carga tumoral del ganglio principal y Carga tumoral total fue de un 14%, se considera una capacidad predictiva baja.

Discusión

1. En relación a el estudio descriptivo.

1.1. En relación al estudio descriptivo de las características clínicas.

En un análisis de la incidencia la supervivencia y la mortalidad de los principales tumores, desde el año 1985 hasta la actualidad, se describió que las mujeres ubicadas en España con cáncer de mama en estadios precoces, se caracterizan por ser una población de mujeres de aproximadamente 60 años, la mayoría en estado hormonal menopáusico, sin antecedentes familiares ni personales de cáncer de mama y con una lesión única no palpable (154), estas mismas características también clínicas definen a la población de nuestro estudio. La mayoría de las pacientes de este estudio se encontraban entre los 50 – 70 años y la media de edad era de 62 años, hay estudios con medias de edad similares a la nuestra (155) (156) (157) y otros estudios donde la media de era ligeramente menor, de 53 a 56 años (158) (146) (159) (143) (151) (142). Entre el 60-70% de las pacientes eran menopáusicas, los porcentajes publicados de menopausia rondan el 60% (160) (161) (162) (163). El 12,7% de las pacientes tenían un familiar de 1º grado con cáncer de mama, en la literatura se ha encontrado que la cifra es similar alrededor del 10% (164).

La incidencia de cáncer de mama bilateral incluyendo sincrónicos y metacrónicos se estima en un 7% (146) (151) En la literatura se recoge una frecuencia de Cáncer bilateral entre el 2-12%, de los cuales alrededor del 1% son simultáneos o sincrónicos (44) (43). En nuestro caso, para los tumores bilaterales sincrónicos, tuvimos una frecuencia de un 1,9%. El 4,9% de las pacientes tenían antecedentes personales de cáncer de mama previo, o cáncer bilateral metacrónico, y en la literatura se ha publicado una frecuencia muy similar del 4% (165) (166).

En cuanto al antecedente de patología benigna previa o cirugía previa, menos del 10% de la muestra había tenido una cirugía previa en la mama afecta por el tumor, y sólo el 6,1% de pacientes habían sido diagnosticadas de alguna patología mamaria benigna. En la literatura se ha encontrado que hasta 25% de las mujeres con cáncer de mama han tenido una biopsia previa por patología benigna (167) (168), esa diferencia se deba posiblemente a la falta de inclusión de este dato en las historias clínicas de algunas de nuestras pacientes.

La ubicación de las lesiones mostraba una mayor tendencia de la mama derecha (59,6%) sobre la izquierda (40,4%). La mayoría de las lesiones estaban ubicadas en el CSE y la unión de los cuadrantes externos de la mama. En otros estudios se ha encontrado que no hay diferencias entre la lateralidad en mama derecha o izquierda (146) y que la localización más común es la retroareolar o el cuadrante superior externo (146), aunque la estratificación de la ubicación de los tumores, es variable de un estudio a otro, y no se ha encontrado estudios con una agrupación similar a la nuestra.

1.2. En relación al estudio descriptivo de las características radiológicas.

En nuestro estudio se ha encontrado que la mayoría de pacientes (78,6%), no se había realizado PAAF de adenopatías clínicamente sospechosas de malignidad, previo a la biopsia selectiva del ganglio centinela. Hay destacar que las pacientes con resultado de PAAF positiva no se incluyen en este estudio, debido a que a esas pacientes se les realiza una linfadenectomía axilar en lugar de una BSGC. No se ha encontrado estudios de diseño y población similar al nuestro que incluyan este porcentaje para poder realizar una comparación.

Por estimación radiológica las lesiones tumorales tenían media de tamaño de 21,22 mm, similar a la encontrada en el estudio de Qiu (169) para la validación del nomograma MSKCC para la estimación de metástasis en el ganglio centinela con factores pronósticos y predictivos tumorales. La mayoría de los estudios, utilizan el

tamaño histológico y no realizan comparaciones entre el tamaño radiológico y el histológico. El 84,8% de las pacientes presentaron lesiones únicas, con una media de 1,19 de lesiones radiológicas, lo que quiere decir que la mayoría solo tenía un foco tumoral visible con técnicas de imagen. El porcentaje de tumores únicos, en la literatura, ronda el 80% (146) (151) (142). En cuanto a los múltiples, un 8.8% de casos de tumores multifocales y un 6,4 % de tumores multicéntricos.

1.3. En relación al estudio descriptivo de las características histológicas.

Se observó que la población de este estudio entre los estadios pT1b, pT1c y pT2, se encuentran el 80% de las pacientes. Osako y colaboradores (143) en un estudio para predecir el estatus de los ganglios no centinela según la carga tumoral OSNA publicaron en sus resultados un porcentaje de tamaño tumoral según estadios distribuidos de la siguiente manera: pT1a 8,1%, pT1b 14,6%, pT1c 42,2%, pT2 27,6% este resultado es acorde con lo encontrado en nuestro estudio así como en otros de diseño similar (162) (159) (146) (155).

La medida de los tumores en el examen histológico, se encontraba ligeramente por debajo del tamaño radiológico. Tanto la media del tamaño total, (17,91mm), como la media del foco mayor (16,4mm), son similares, y son menores que la media del tamaño radiológico (21,22±14,98). La mayoría de los trabajos revisados solo incluyen la media de tamaño histológico, se ha encontrado trabajos donde la media del tamaño, es similar como el de Peg (150), algunos con una media poco un menor (146) (155) y otros con medias un poco mayores como el de Piñero (151), pero siempre cercanas a los 2 cm. El número de focos encontrados en análisis patológico era muy similar a lo encontrado en el número de focos radiológicos, la mayoría de los tumores eran lesiones únicas.

El porcentaje de tumores lobulillares fue del 14,3% y el de los ductal infiltrante del 83,5% y un 2,2% de otros tipos histológicos. Otros trabajos publican una distribución de alrededor del 70% para los tumores de tipo ductal, y de alrededor del

10% para el tipo lobulillar (170) (171), pero también hay publicaciones con un porcentaje ductal infiltrante similares al nuestro (155) (159) (143) (146) (151) (142). Se observó componente Intraductal extenso en un 22,8% de la muestra, en los pocos estudios donde se incluye el componente Intraductal, el porcentaje de componente Intraductal extenso es mayor (172) (173).

La mayoría de los tumores eran grado II, un 41,9%, seguido por el grado III un 30% y el grado I un 28,2 %. Aunque los tumores grado II, suelen ser los más comunes en la mayoría de las series (155) (159) (146) (142) (150). También podemos encontrar estudios con mayoría de tumores Grado I (174). Las variaciones en estas cifras y en la de los tipos histológicos, se pueden deber a diferencias en las poblaciones como los tipos de estadios tumorales incluidos.

Los tumores con infiltración de piel solo fueron un 3,2% del total, no se ha encontrado estudios de diseño similar que incluyan el estudio de la infiltración de piel. La infiltración linfovascular se presentó en un 17,4%, en la mayoría de los artículos revisados la ILV está alrededor del 20% (159) (146) (174)

1.4. En relación al estudio descriptivo de las características moleculares.

Al tratarse de tumores con factores pronósticos favorables, la mayoría tenían expresión de Receptores de Estrógenos (87,7%) y Progesterona (77,0%), en los estudios que hemos revisado esta distribución es similar (155) (143) (174) (150). El 7,0% de los tumores eran Her2 positivo, un poco más bajo que lo encontrado en otros estudios que suele ser de alrededor del 10%-15% (155) (143) (146) (174) (150). La expresión media de Ki67 era del 17%, similar a lo que se encuentra en la literatura (143) (155) (150). En la mayoría de los tumores no se encontraba expresión de P53 (78,0%), un poco menor de lo encontrado en otras publicaciones (163). El subtipo molecular más común fue el Luminal A un 52,5%, seguido del Luminal B Her2 negativo 30,2%, otras series han encontrado 32-39% de Luminal A seguido también por el Luminal B Her2 negativo con un 36-38% de casos (149) (151) (142).

1.5. En relación al estudio descriptivo de la carga tumoral OSNA.

La afectación ganglionar es fundamental para establecer la estadificación de la enfermedad y es uno de los factores pronósticos más estudiados en el cáncer de mama (160). Actualmente es la BSGC es el procedimiento indicado para realizar el diagnóstico de la afectación axilar y la indicación de una Linfadenectomía Axilar, por el hallazgo de un ganglio centinela positivo, está cambiando. Los nuevos estudios buscan toda la información que se puede obtener del análisis del GC, intentando hacer el menor número de linfadenectomías posibles (137).

La cuantificación de la carga tumoral que tiene el ganglio centinela, a través del método OSNA, ha hecho que surjan diversos estudios que plantean establecer nuevos puntos de corte (159) (162) y diferentes análisis matemáticos de la carga tumoral (143). Utilizando estas posibilidades, hemos creado múltiples variables para estratificar la carga tumoral OSNA. Aunque los puntos de cortes surgieron en otros estudios nunca se han reunido en un solo estudio para su análisis, por lo tanto no se encuentran estudios de diseño similar al nuestro en la literatura.

La media de GC extraídos por paciente fue de $1,59 \pm 0,697$ GC, algunas series reportan medias mayores de alrededor de 2 GC (162) (141). Se ha encontrado que la mayoría de los ganglios centinela eran negativos un 65,84%, con un 4,9% de CTA, y entre los GC positivos un 15,31% de micrometástasis (>250-5000 copias de OSNA), y un 14,24% de macrometástasis (>5000 copias de OSNA), este resultado es acorde a lo encontrado en la mayoría de los estudios similares, hay publicado desde un 33 % a un 39% de ganglios positivos (146) (147) (160) (161) (142). En cuanto a las células tumorales aisladas lo que se encuentra en la literatura es que el porcentaje es menor del 10% (175) (176) (175).

1.5.1. En relación al estudio descriptivo de la carga tumoral del ganglio principal.

En la carga del ganglio centinela con mayor número de copias de mANR de CK19, Se observó una gran dispersión de los valores registrados con una desviación estándar incluso ligeramente mayor que la media ($73851,78 \pm 532600,11$). La conversión en logaritmo neperiano, permitió un análisis mejor de los resultados. El utilizar la carga tumoral del ganglio principal, está fundamentado estudios que han asociado que mientras mayor sea tamaño de la metástasis de un ganglio centinela, hay mayor posibilidad de existencia de afectación de ganglios no centinela (158) (141). En cuanto a los estudios que utilizan variables similares con OSNA, los resultados por encima de 5000 copias de carga tumoral en un GC se asocian a mayor posibilidad de metástasis en ganglios no centinela (143) (162) (174).

Las pacientes con carga tumoral del ganglio principal de 250 copias fueron un 37,4%, entre estas pacientes el porcentaje de casos con el GC con valor máximo, entre 250 y 5000 copias o micrometástasis, fue de 19,9%, mientras que en número de pacientes con GC de valor máximo mayor de 5000 copias, o macrometástasis, fue del 17,5%. Al utilizar el punto de corte de 7700 copias, un 15,6 % de pacientes serían diagnosticados de ganglio centinela positivo, a diferencia de un 17,5 % de pacientes con ganglios centinela positivos si utilizamos el punto de corte de >5000 copias, que se utiliza en la práctica clínica para definir las macrometástasis, con el método OSNA. Aunque en el estudio de Deambrogio (153) donde surgió el punto de corte de 7700 copias, explican que con >7700 copias en un GC se tiene mayor valor predictivo positivo de metástasis en los ganglios no centinelas, que con el punto de corte de macrometástasis de 5000 copias, la diferencia de paciente a quienes afectaría es relativamente baja, de cada 100 pacientes, 2 no serían diagnosticadas de GC positivos con el punto de 5000 copias y si con el de 7700 copias.

1.5.2. En relación al estudio descriptivo de la carga tumoral total.

La carga tumoral total o la sumatoria del número de copias de mANR de CK19 de cada ganglio centinela en una misma paciente, surgió de un estudio diseñado en Barcelona en el 2013 por Peg y colaboradores (150), con la intención de buscar el punto de corte de carga tumoral total que predijera de mejor manera la posibilidad de metástasis en los ganglios no centinelas, posteriormente Rubio y colaboradores (144) también en España en 2013 confirman el concepto de la carga tumoral total y lo integran a un nomograma junto con otros factores pronósticos y predictivos del cáncer de mama, con la idea de mejorar la predicción de metástasis en los ganglios axilares. Al analizar la carga tumoral, en este estudio, se ha observado que tiene una gran dispersión, al igual que con la variable anterior, se ha visto como la desviación estándar resultó mayor que la media, $83697,2 \pm 560636,64$ copias. Esta gran variabilidad hace que cuando la misma variable se expresa en logaritmo neperiano es más fácil su manejo y análisis, por lo que solo utilizamos para la carga tumoral total en logaritmo, la media en logaritmo fue $5,67 \pm 3,04$ copias. En los primeros estudios que utilizaron la carga tumoral total (151) (144) (150) también emplearon la conversión en logaritmo para hacer el análisis estadístico. Estos autores explican que el logaritmo neperiano permite compensar que se trate de una variable no continua. En otros estudios para un mejor análisis de la carga tumoral total, hacen estratificaciones de la carga tumoral con diferentes puntos de corte (142).

La carga tumoral total se ha analizado en otros estudios, y en todos encuentran que a mayor carga tumoral total mayor posibilidad de ganglios no centinela positivos (143) (149) (151) (142). En el estudio de Peg y colaboradores se establece que un punto de corte de 15000 copias carga tumoral total tiene mejor sensibilidad y especificidad, valor predictivo positivo y negativo, para predecir la existencia de metástasis en los ganglios no centinelas, en nuestro estudio las pacientes con carga tumoral total >15000 fueron un 13,6%.

1.5.3. En relación al estudio descriptivo de la distribución de la carga tumoral.

El estudio de Osako (12) utilizando el análisis de GC por OSNA, encontró que el número de GC positivos, el número de GC con macrometástasis, y el ratio de Número de GC/ número de GC positivos, están asociados a la presencia de metástasis en los ganglios no centinelas. Igualmente el estudio de Milner (177), encuentra que a mayor número de GC positivos o el ratio de GC/GC positivos, mayor posibilidad de existencia de ganglios no centinela con metástasis. Otros estudios, además, han encontrado peor pronóstico para aquellas pacientes donde todos los ganglios centinela extraídos son positivos, y mejor para aquellas que tienen algún ganglio negativo y otro positivo entre sus ganglios centinelas (162) (137). Por ese motivo hemos analizado la distribución de la carga tumoral OSNA entre los GC de una misma paciente con las variables carga tumoral promedio y frecuencia de GC positivos.

Recordamos que la variable carga tumoral promedio la obtuvimos del promedio resultante de la carga tumoral total entre el número de ganglio positivos, (>250 copias). A pesar de este promedio la variable también mostró mucha dispersión, una media de $136169,06 \pm 583601,93$ copias. Mientras que al convertirla en logaritmo la media fue de $8,31 \pm 2.62$ copias.

Debido a que se ha demostrado la importancia del número de ganglios centinela positivos para el pronóstico de la paciente (150) (144), en el análisis de la distribución de la carga tumoral también analizamos el número de ganglios centinela positivos. Utilizando un punto corte de 250 copias de carga, un 29,4% de pacientes tenían un ganglio positivo, y un 7,8% de pacientes tenían dos o más ganglios positivos. Estableciendo un punto corte de 5000 copias de carga tumoral para los ganglios positivos, un 82,5% de pacientes no tenían ningún ganglio positivo, un 13,3% de pacientes tenían 1 ganglio positivo, un 4,1% pacientes tenían dos o más ganglios positivos.

2. En relación al estudio univariante.

La mayoría de estudios actuales que utilizan la carga tumoral OSNA, estudian los factores asociados a la afectación de los ganglios no centinelas. El auge del conocimiento del estatus de los ganglios no centinela se debe a en una proporción nada despreciable de pacientes con ganglio centinela positivo, el resto de ganglios de una linfadenectomía no presentan metástasis, en el estudio Z011 de la AGOSG liderado por Giuliano (137), se demostró que en pacientes con tumores en estadios iniciales y con factores pronósticos favorables es posible no realizar linfadenectomía axilar aun en presencia de metástasis del GC. En este estudio se han analizado los factores pronósticos y predictivos que están asociados a la afectación del ganglio centinela a través de las diferentes expresiones de la carga tumoral OSNA. Se estudió la asociación de los factores pronósticos y predictivos que hemos clasificado como características clínicas, radiológicas, histológicas y moleculares y la carga tumoral OSNA en diferentes exploraciones (carga tumoral del GC principal, carga tumoral total y distribución de la carga tumoral)

2.1. En relación a la asociación de las características clínicas con la carga tumoral OSNA.

De las características clínicas estudiadas la edad, el estado hormonal premenopáusico y lateralidad del tumor en mama derecha, mostraron relación estadísticamente significativa con la carga tumoral OSNA.

Se observó como las pacientes de menor edad tenían mayor tendencia a la afectación del ganglio centinela y además presentaban mayor grado de afectación del mismo y esta relación fue estadísticamente significativa en tres de las exploraciones: carga tumoral del ganglio principal, carga tumoral total, y frecuencia de ganglios centinela>250 copias. En la bibliografía se ha encontrado estudios que encuentran significación estadística en la edad, como factor predictivo de la afectación ganglionar, por ejemplo el de Madsen (176) y Bevilacqua (146). Mientras que otros estudios (143)

(160) (161) (150) (169) (144) y la revisión sistemática de Postaci (163), descartan la edad como factor predictivo de la afectación ganglionar.

Algunos estudios han mostrado asociación entre el antecedente de una biopsia en la mama y la posibilidad de desarrollar cáncer de mama (8) (9). Aunque, como se ha referido en la introducción, se ha visto que no todas las lesiones benignas de mama confieren el mismo riesgo, y por lo tanto la relación no se debe a la biopsia en sí misma (10) (11) (12). En cuanto a la relación entre las lesiones benignas de la mama y la afectación de ganglios por células tumorales, algunos estudios no han encontrado relación (13), mientras que otros estudios refieren que si han observado mayor incidencia de metástasis ganglionares asociado a las lesiones benignas proliferativas o con atipia (7).

Los tumores de mama hereditarios, como BRCA 1 y 2, se asocian a peor pronóstico. Sin embargo, mientras los tumores de mama de pacientes portadoras de BRCA1, no están asociados mayor afectación axilar, las pacientes portadoras de BRCA2 si muestran tumores con mayor afectación axilar (178). En nuestra muestra no recogimos el antecedente de ser portador de mutaciones deletéreas en estos genes. El antecedente de cáncer de mama previo o bilateral metacrónico no parece tener asociación con mayor afectación axilar, o por lo menos no hay estudios que lo confirmen. Tampoco se ha encontrado asociación entre el cáncer de mama bilateral sincrónico con una mayor afectación de los ganglios centinelas.

Las pacientes que en el momento del diagnóstico eran premenopáusicas, mostraron mayor carga tumoral OSNA del GC, el resultado fue estadísticamente significativo en las variables: carga tumoral del ganglio principal, carga tumoral total, también con el punto de corte de 15000 copias y frecuencia de ganglios > 250 copias. Las mujeres en estado premenopáusico tenían una media de carga tumoral total mayor a las de las mujeres menopáusicas, sin embargo el valor de p fue de 0,048, casi al límite de la significación estadística. En el punto de corte de 15000 copias, se observó que las mujeres con estado hormonal premenopáusico tenían mayor número de casos de carga tumoral total por encima de las 15000 copias. En la literatura se ha encontrado estudios que relacionan la afectación ganglionar al estado hormonal

premenopáusico (179). Sin embargo, la mayoría de los estudios (160) (161) (162) y la revisión sistemática de Postaci (163) que incluye a su vez 6 estudios sobre factores predictivos, descartan la relación entre el estado hormonal de las pacientes con la afectación ganglionar.

Las pacientes en las que la localización del tumor era en la mama derecha, mostraban ganglios centinela con mayor carga tumoral del ganglio principal incluyendo los puntos de corte de 250 copias y de 7700 copias y también con la carga tumoral total. La localización de tumor en mama derecha o izquierda no aparece en estudios revisados, como factor predictivo de la afectación axilar, la mayoría de los estudios solo buscaron la asociación con la ubicación del tumor dentro de la mama y no diferenciaron en tumores de mama derecha o izquierda (161) (146).

La ubicación de la lesión tumoral en cuadrantes de la mama, no mostró relación con ninguna de las variables de afectación ganglionar. En el estudio de Yoshihara (161) encontraron asociación entre los tumores ubicados retroareolares y los de cuadrantes externos con mayor tendencia a la afectación ganglionar, y en el estudio de Bevilacqua (146) observaron que son los tumores retroareolares los que tienen mayor asociación con afectación ganglionar. A diferencia del nuestro, estos estudios incluían todos los ganglios de la disección axilar.

Estudios como el de Chua (147), Gil (172) y Skinner (42), encontraron que los tumores palpables se asocian con mayor afectación axilar tumoral, sin embargo en este estudio no se ha encontrado dicha asociación. Esta diferencia puede estar causada porque en los otros estudios incluyen el análisis la linfadenectomía axilar como base. Sin embargo en el estudio de Rivadeneira (156), los autores tampoco encontraron asociación entre la palpación tumoral con la aparición de afectación tumoral ganglionar. Otros estudios han encontrado relación significativa entre el hecho de que un ganglio axilar sea palpable y la existencia de metástasis tumorales en el mismo (147).

2.2. En relación a la asociación de las características radiológicas con la carga tumoral OSNA.

La mayoría de las características radiológicas mostraron relación estadísticamente significativa con las variables respuesta, a excepción de la realización de PAAF de los ganglios, previa a la realización de la BSGC.

El antecedente de haber realizado una PAAF de algún ganglio axilar, previa a la realización de la BSGC, mostró relación con un mayor número de casos de GC >5000 copias. Se observó una diferencia significativa en el grupo de 2 o mas GC >5000, mientras que para las pacientes donde no se realizó PAAF fue de 2,8%, para las pacientes que se había realizado PAAF fue de 9,1%. Si existe alguna relación entre la realización de PAAF, es débil, ya que sólo se observó en una de las variables de la afectación del ganglio centinela, pero se explicaría por los falsos negativos de la realización de PAAF en un ganglio clínicamente sospechoso, no se ha encontrados estudios que confirmen o contradigan este hallazgo.

Se ha encontrado que a mayor número de lesiones radiológicas mayor carga tumoral OSNA y esta relación se observó con todas las variables dependientes. Aunque algunas de estas relaciones sean de baja potencia estadística, como los coeficientes de correlación de pearson en carga tumoral del ganglio principal, carga tumoral total y carga tumoral promedio, el que la variable número de lesiones radiológicas, se asocie con todas las variables respuesta, nos hace pensar que el tener más de una lesión tumoral aumenta la posibilidad de tener mayor carga tumoral en el ganglio centinela, así como un mayor número de ganglios centinela positivos. No se ha encontrado estudios que incluyeran el número de lesiones radiológicas como factor pronostico de afectación ganglionar, pero la presencia de más de un foco tumoral si se describe como factor predictivo de metástasis ganglionar (142) (145) (148) (147) (169).

El tipo de foco tumoral también mostró una asociación con todas las variables dependientes. La media de carga OSNA fue menor para los tumores únicos, y entre los multifocales y multicéntricos, la media de carga tumoral era ligeramente mayor para los tumores multicéntricos. Con el punto de corte de 15000 copias de carga tumoral

total, los tumores multicéntricos tenían mayor número de casos con >15000 copias (38,5%), que los tumores multifocales (22,9%), mientras con el punto de corte de 250 copias de carga tumoral del ganglio principal, los tumores multifocales (58.3%) estaban ligeramente por encima de los multicéntricos (57,7%). Igualmente utilizando el punto de corte de 5000 copias, los tumores multifocales tenían más pacientes con ganglios entre 250-5000 y los multicéntricos mas casos de pacientes con GC mayores de 5000 copias, por lo que se intuye un gradiente de mayor carga tumoral en los ganglios de pacientes con tumores multicéntricos, sobre los multifocales, cuando la carga tumoral está por encima de las 5000 copias, pero cuando la carga tumoral es menor este gradiente se invierte. En la frecuencia de ganglios positivos >250 copias, los tumores multifocales tienen mayor porcentaje de 1 GC > de 250, mientras las pacientes con tumores multifocales tienen mayor número de casos con dos o más GC >250 copias. Este comportamiento se repite en las variable Número de GC > de 5000 copias. La multiceñtralidad y multifocalidad ya ha sido descrita en otros estudios como factor pronostico de la afectación ganglionar (142) (145) (148) (147) (169). En el estudio de Yoshihara (161) lo describen como un factor pronostico independiente. Sin embargo puede haber un factor de confusión ya que el tamaño tumoral total suele estar aumentado cuando hay mayor número de focos. Hay estudios que no incluyen (176) tumores multifocales ni multicéntricos alegando que cada foco tumoral tiene sus propias características, que pueden influir en la posibilidad de afectación del ganglio centinela.

El tamaño radiológico total mostró relación estadísticamente significativa con todas las variables respuesta: a mayor tamaño, mayor carga tumoral OSNA. Es el mismo comportamiento observado en las asociaciones con el tamaño histológico, que describiremos más adelante. Se ha encontrado un estudio que utilizó el Tamaño radiológico y el tamaño histológico, ambos con asociación significativa con las metástasis ganglionares (174). Pero para estudiar los factores predictivos de la afectación ganglionar la mayoría de los estudios no utilizan el tamaño radiológico o clínico, sólo utilizan el tamaño histológico y lo encuentran como factor predictivo de la afectación ganglionar (148) (147) (145) (143) (150) (169) (144)

2.3. En relación a la asociación de las características histológicas con la carga tumoral OSNA.

El grupo de las características histológicas es donde se han encontrado más variables relacionadas con la afectación ganglionar, la única variable que no mostró ninguna relación fue el componente Intraductal, y el tipo histológico sólo mostro relación con dos de las variables dependientes.

El estadio pT mostró asociación con casi todas las variables dependientes, a excepción del punto de corte de 15000 de carga tumoral total y la carga tumoral promedio. Se observó como la carga tumoral del ganglio principal y la carga tumoral total, aumentaban proporcionalmente según aumentaba el estadio pt. Destaca en el análisis de la carga tumoral total la media del tamaño tumoral del estadio pT1b era menor que para el pT1a, y en la variable carga tumoral del ganglio principal la media del estadio pT1b es menor que la media del estadio pT1c, y en los puntos de corte 250, 5000 y 7700, las pacientes con tumores en estadios pt2 y pt3 mostraron un mayor número de casos con cargas >5000 y >7700 copias, que las pacientes en estadios pT1, sin embargo también se ve una diferencia paradójica entre el pT1a y pT1b, mostrando el pT1a mayor número de casos con cargas >5000 y >7700 copias, que las pacientes en estadios pT1b. En la distribución de la carga tumoral se observó que el número de casos de pacientes con dos o más ganglios centinela de >250copias, son aquellas pacientes en estadios pT2 y pT3. En la variable Número de GC >5000 copias se observó algo similar. En estas variables, también algunos porcentajes de casos del estadio pT1, no siguen un gradiente. El que los tumores de estadio pT1, no sigan un gradiente de a mayor estadio mayor porcentaje de pacientes, quizás se deba que tengamos un análisis demasiado estratificado y quizás se corregiría unificando el estadio pT1. Otros estudios han encontrado que no hay diferencia entre los tumores pT1a y pT1b en la afectación ganglionar (142). Además se ha publicado que son los tumores de más de 2 cm lo que se asocian con mayor afectación de los ganglios axilares (174) (157). Se ha descrito que, el porcentaje de metástasis ganglionares estimado para el total de ganglios de una LA, según el estadio pT tumoral según los estadios: pT1mic de 10%, pT1a 9 a 13%, pT1b de 13 a 19%, pT1c 26 a 29%, pT2 39 a

59%, y pT3 71 a 80% (146). Madsen (176) observa que mientras mayor sea tamaño tumoral, mayor es la cantidad de ganglios con macrometástasis, mientras que los ganglios con micrometástasis conservan una proporción más estable y no directamente proporcional. Por nuestra parte se ha observado como las variables con carga OSNA >5000 copias, tienen asociación con un mayor tamaño tumoral y conservan un gradiente según el estadio pT.

El Tamaño histológico total ha mostrado relación con todas las variables dependientes. A mayor tamaño, mayor media de carga tumoral del ganglio principal y tumoral total. Con la carga tumoral del ganglio principal Se observó un coeficiente de correlación de Pearson muy cercano al +1, lo que evidencia que la asociación es fuerte. Se observó una mayor media de tamaño tumoral para pacientes con tumoral total mayores 15000 copias de carga tumoral total y con carga tumoral del ganglio principal > 250, >250-5000, >5000 y >7700 copias. En la frecuencia de ganglios >250 copias, las pacientes con dos o más ganglios de >250 copias, tenían mayor media de tamaño tumoral, pero en el punto de corte de >5000 las medias de tamaño tumoral tanto para las pacientes con un GC o con dos GC >5000 son muy parecidas. La relación del tamaño del foco mayor con la carga tumoral OSNA, es muy similar a la encontrada con la variable tamaño histológico total y del foco AP mayor. El tamaño ha sido confirmado como factor pronóstico de la afectación ganglionar en múltiples estudios, sin importar el método del análisis del GC, o si los factores predictivos son para el ganglio centinela o para los ganglios no centinela (143) (147) (145) (148) (160) (149) (180) (142), pero por lo general se utiliza el tamaño del foco mayor, y no se buscan las diferencias entre tamaño histológico total, tamaño foco mayor y tamaño radiológico .

En la asociación con el número de lesiones radiológicas se observó que a mayor número de focos, mayor posibilidad de ganglios positivos y con mayor carga tumoral OSNA. En la variable número de focos radiológicos se encontraron más asociaciones con las variables respuesta y cierta tendencia a ser más fuertes estadísticamente que con la variable número de focos AP. La media de carga tumoral total fue similar tanto para lesiones radiológicas como para Focos AP. Con los puntos de corte de 250 y 5000 copias se observa asociación estadísticamente significativa con el número de lesiones radiológicas mientras que con el número de focos AP no hay

relación. Con el punto de corte de 7700 hay relación significativa en ambas pero las medias son diferentes. Para la variable carga tumoral promedio nuevamente Se observó relación con lesiones radiológicas pero no con focos AP. En la frecuencia de ganglios >250 y >5000 copias hay relación tanto para focos AP como para radiológicos pero las medias no se parecen. No se ha encontrado estudios que tengan una comparación entre el número de lesiones radiológicas, el número de focos AP y la afectación del GC.

El tipo histológico tumoral, tuvo asociación con dos de las variables de la distribución de la carga tumoral: carga tumoral promedio y frecuencia de ganglios > 5000 copias. Se observó que el tipo histológico lobulillar tenía mayor media carga tumoral promedio. Los tumores de tipo histológico lobulillar presentaron un porcentaje mayor de casos con ganglios centinela positivos, si se utilizaba como punto de corte 5000 copias de carga tumoral. Se ha descrito la posibilidad que el tipo histológico influya sobre las metástasis ganglionares, pero no queda claro la diferencia entre el tipo ductal y lobulillar (146) En estudios que buscan asociación entre tipo histológico y la afectación de los ganglios no centinelas, no se encuentra relación con el tipo histológico tumoral, (143) (149) (174) (150) (144). En el estudio de Heilman (162) que busca factores predictivos de la afectación del GC, utilizando OSNA no encontraron asociación entre el tipo histológico tumoral y la afectación de GC.

El componente intraductal no mostró relación con la carga tumoral OSNA. Muy pocos estudios incluyen la presencia de componente intraductal como factor pronóstico, en el estudio de Yenidunya (173), a diferencia del nuestro, se encontró asociación entre el componente Intraductal extenso para mayor cantidad de ganglios positivos al realizar linfadenectomía.

Las variables carga tumoral del ganglio principal (con los puntos de corte 250, 5000 y 7700), carga tumoral total y frecuencia de ganglios positivos (>250 y >5000), mostraron asociación estadísticamente significativa con el grado histológico. Se observa que los tumores grado I, tienen menor carga tumoral OSNA que los tumores grado II Y grado II, sin embargo, en algunas variables los tumores Grado II tenían mayor número de casos con mayor carga tumoral OSNA que los Grado III, esta

diferencia entre los tumores grado II sobre los tumores grado III, observa en varios estudios (147) (145) (148) (142) (169). Sin embargo en otros estudios los tumores grado III tienen mayor afectación ganglionar que los grado II. En el estudio de Rivadeneira (14) en cuanto al grado tumoral, concluyen, que los pacientes con tumores grado histológico III tienen 2,5 más probabilidades de tener ganglios afectados que los pacientes con tumores grado I. Otros estudios no encuentran relación entre el grado histológico y las metástasis ganglionares (149) (143) (150) (144).

Se encontró asociación entre los tumores que infiltran la piel, y todas las variables: de la carga tumoral OSNA, a excepción de la variable carga tumoral promedio. Llama la atención que las diferencias de media o del porcentaje de casos en los tumores que infiltran la piel, son muy marcadas. En ninguno de los estudios revisados se incluyó la infiltración de piel como factor predictivo de la afectación tumoral de los ganglios.

Con la ILV se ha encontrado las mismas asociaciones que con la infiltración de piel, la única variable que fue significativa era la carga tumoral promedio y también destaca que las diferencias de media o del porcentaje de casos de afectación ganglionar en los tumores con ILV, son muy marcadas. La ILV se ha clasificado como factor predictivo para metástasis ganglionares (142) (147) (161) (145) (149) (174) (180) (150) (169) (144). En el estudio de Heilman (162), no encontró relación, utilizando las Invasión linfática y la invasión vascular como variables separadas, para la aparición de metástasis en el GC analizado por OSNA.

2.4. En relación a la asociación de las características moleculares con la carga tumoral OSNA.

En este grupo no se encontró asociación de los Receptores hormonales, Her2, Ki67, P53 o Subtipo Molecular con la carga tumoral OSNA.

Aunque estos factores moleculares, son muy utilizados en la práctica clínica para la planificación del tratamiento, su papel como factores pronósticos o predictivos de la afectación ganglionar no está claro. Muchos estudios no han encontrado

asociación (12) (160) (161) (176) (157). El estudio Heilman (162) que busca factores predictivos de afectación del GC, analizado por OSNA, no encuentra relación entre Los RE, RP y de Her2 con la afectación de GC. Así mismo la revisión sistemática de Postaci (163) descarta la relación con receptores de estrógeno y progesterona, Her2, Ki67 y p53 con la presencia de metástasis en los ganglios axilares.

Sin embargo, hay que destacar que otros estudios que mencionaremos a continuación, sí que encuentran asociaciones entre las características moleculares y la afectación ganglionar. Se ha publicado asociación entre las metástasis ganglionares con el RP, mientras que no con el RE (149) (142).

En cuanto al oncogén HER2, se ha descrito una relación entre la presencia de Her2 con la afectación de metástasis en el GC (147) (174) (150) (144), incluso se describe como un factor fuerte e independiente de la afectación ganglionar, por ejemplo el estudio de Chae (158).

Se ha descrito que altos niveles de Ki67 se asocian a mayor probabilidad de recaída en cáncer en estadios tempranos, independientemente de la afectación axilar (75), sin embargo algunos estudios encuentran asociación entre el Ki67 y la afectación metastásica ganglionar (142)

En cuanto a subtipos moleculares también se ha encontrado evidencia a favor y en contra. Existen varios artículos que estudian la asociación de los subtipos moleculares con la afectación ganglionar la mayoría de los artículos utilizan, como lo hemos utilizado en este estudio, los criterios de St Gallen (84). El estudio de Sawaki (181) encuentra asociación con los subtipos moleculares con la afectación ganglionar, pero tomando en cuenta el tamaño tumoral. Otros estudios no han encontrado relación entre los subtipos moleculares y las metástasis ganglionares (143) (182) y Madsen (176), aunque describe cierta tendencia a la afectación ganglionar de los tumores triple negativos, no encuentra asociación estadísticamente significativas. El estudio de Bernet (149), solo encuentra asociación en el modelo univariante, entre los subtipos moleculares y la afectación de los ganglios (149). Son los tumores basales o triple negativos los que parecen no estar asociados a mayor afectación ganglionar, el mal pronóstico de estos tumores no tiene porqué estar conferido únicamente por la

presencia de metástasis axilares, es la biología del tumor en si lo que le confiere el mal pronóstico (183) (180). Las plataformas como el Mammaprint y el Oncotype, han sido ideadas para que los tumores con GC negativo, sean clasificados de bajo o de alto riesgo, por lo que hay una cierta independencia implícita entre los subtipos moleculares y la afectación ganglionar (83).

3. En relación al estudio multivariante.

Se ha encontrado que el tamaño patológico total y la ILV, son factores que predicen mayor carga tumoral del ganglio centinela principal y carga tumoral total. Las demás variables que han mostrado resultados significativos, se asocian a través del tamaño patológico total e ILV, por lo tanto, no tienen un efecto independiente. Sin embargo la capacidad predictiva de tamaño patológico total e ILV fue baja, de un 14%, tanto con la carga tumoral del ganglio centinela principal como para carga tumoral total. Esto se debe a que el valor de la carga tumoral OSNA depende de múltiples variables, y algunas pueden no estar contenidas en este análisis. Otros estudios han encontrado el tamaño y la ILV en análisis multivariante como predictivo de las metástasis ganglionares (174)

En la literatura el tamaño tumoral y la ILV son unos de los factores predictivos más fuertes. Otros autores, como Viale (160) y Yoshihara (161), en línea con nuestros resultados, han considerado que, aunque el tamaño y la ILV son factores predictivos independientes para la afectación ganglionar, este valor predictivo positivo es bajo para recomendar tomar decisiones sobre el tratamiento axilar de las pacientes, utilizando únicamente el tamaño y la invasión linfovascular. Revisiones sistemáticas como la de Patani (148) y Postaci (163) no recomiendan que el uso de factores pronósticos y predictivos sustituyan el análisis de la afectación axilar con Biopsia selectiva del ganglio centinela.

Conclusiones

1. En la población de este estudio, la mayoría de las pacientes candidatas a BSGC son pacientes de edad media, en estado hormonal menopáusico, sin antecedentes familiares ni personales de cáncer de mama y con una lesión única no palpable, de menos de 2 cm, tipo ductal infiltrante, con receptores hormonales positivos y subtipo tumoral Luminal A.

2. La carga tumoral del GC cuantificada mediante OSNA es una variable cuantitativa no lineal que presenta gran dispersión matemática y por tanto amplia variabilidad, lo que complica su utilización en la práctica clínica. La transformación logarítmica permite una aproximación a la normalidad y facilita la interpretación, tratamiento y aplicabilidad de los resultados.

3. De todos los factores estudiados asociados a la supervivencia y respuesta a los tratamientos del cáncer de mama, los que se relacionan de forma significativa con la carga tumoral en el ganglio centinela (o con el número de copias de ARNm de Ck 19 en el GC) son:

- Clínicos: edad, estado menopáusico y localización tumoral.
- Tumoraes: tamaño tumoral, presencia de multifocalidad y número de focos, ILV, invasión de piel, grado de diferenciación y tipo histológico.

4. La carga tumoral OSNA es mayor en mujeres premenopáusicas, con tumores indiferenciados, de tipo lobulillar, en presencia de ILV, o de afectación de piel, y se correlaciona con el número de focos y el tamaño tumoral y de forma inversa con la edad. Sin embargo, solamente el tamaño histológico y la invasión linfovacular guardan una relación de carácter independiente.

5. No se ha encontrado un punto de corte de carga tumoral OSNA que se relacione de forma más sólida con los parámetros analizados. Sin embargo, el utilizar puntos de corte también es útil para vencer la falta de linealidad y la gran dispersión de la carga tumoral OSNA.

6. De las aproximaciones analizadas en este estudio de carga tumoral OSNA para la definición de afectación del ganglio centinela (carga tumoral del ganglio principal, carga tumoral total y distribución de la carga tumoral), no hay ninguna que se correlacione mejor con los parámetros analizados.

Bibliografía

1. **EUCAN, OMS.** <http://eco.iarc.fr/EUCAN/Default.aspx>. [En línea]
2. **Consumo, Ministerio de Sanidad y.** <http://msssi.gob.es>. [En línea] La situación del Cáncer en España.
3. **(ACS), American Cancer Society, (UICC), Unión Internacional contra el Cáncer y (IARC). Agencia Internacional de Investigación en Cáncer.** <http://canceratlas.cancer.org/>. [En línea] The Cancer Atlas. .
4. *Disparities in breast cancer mortality trends between 30 European countries: retrospective trend analysis of WHO mortality database.* **Autier P, Boniol M, La Vecchia C, Vatten L, Gavin A, Héry C, Heanue M.** s.l. : BMJ, 2010 Aug , Vol. 11;341:c3620.
5. *Breast cancer mortality in neighbouring European countries with different levels of screening but similar access to treatment: trend analysis of WHO mortality database.* **Autier P, Boniol M, Gavin A, Vatten LJ.** s.l. : BMJ, 2011, Vol. 343: d4411.
6. **(SEOM), Sociedad Española de Oncología Médica.** <http://seom.org>. [En línea] Cifras del Cáncer en España, 2017.
7. *Breast cancer surgery: an historical narrative. Part II. 18th and 19th centuries.* . **Sakorafas GH, Safioleas M.** s.l. : Eur J Cancer Care (Engl)., 2010 Jan , Vols. 1;19(1):6-29.
8. *Effect of screening and adjuvant therapy on mortality from breast cancer.* . **Berry DA, Cronin KA, Plevritis SK, Fryback DG, Clarke L, Zelen M, et al.** s.l. : N Engl J Med. , 2005 , Vols. Oct 27;353(17):1784-92.
9. *Age-specific spatio-temporal patterns of female breast cancer mortality in Spain (1975-2005).* **Ugarte MD, Goicoa T, Etxeberria J, Militino AF, Pollán M.** s.l. : Ann Epidemiol, 2010 Dec, Vols. 20(12):906-16.
10. *Significance and problems of histopathological examination and utility of real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction method for the detection of sentinel lymph node metastasis in breast cancer.* **Kurosumi M, Takei H.** s.l. : Breast Cancer, 2007, Vols. 14(4):342-9.
11. *Quantification of changes in breast cancer incidence and mortality since 1990 in 35 countries with Caucasian-majority populations.* **Hery C, Ferlay JM, Boniol M, Autier P.** s.l. : Ann Oncol., 2009, Vols. 19:1187–1194.

12. **Izquierdo A, Gispert R, Saladie F, Espinas JA. Análisis de la incidencia, la supervivencia y la mortalidad según las principales localizaciones tumorales, 1985 a 2019: Cáncer de mama.** s.l. : Med Clin (Barc), 2008, Vols. 131(Suppl 1):50–52.
13. *Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction.* **Weigel MT, Dowsett M.** s.l. : Endocr Relat Cancer. , 2010 , Vols. Sep 23;17(4):R245-62.
14. *Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction.* **Weigel MT, Dowsett M.** s.l. : Endocr Relat Cancer., 2010 Sep, Vols. 23;17(4):R245-62.
15. **AJCC . Cancer Staging Manual, Seventh Edition .** s.l. : Springer New York, Inc, 2010.
16. *Is the TNM staging system for breast cancer still relevant in the era of biomarkers and emerging personalized medicine for breast cancer: an institution's 10-year experience.* **Orucevic A, Chen J, McLoughlin JM, Heidele RE, Panella T, Bell J.** s.l. : Breast J., 2015, Vols. Mar-Apr;21(2):147-54.
17. *The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more "personalized" approach to cancer staging.* **Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershengwald JE, Brookland RK, et al.** s.l. : CA Cancer J Clin., 2017, Vols. Mar;67(2):93-99. .
18. *Breast cancer epidemiology, prevention, and early detection.* **Brewster A, Helzlsouer K.** s.l. : Curr Opin Oncol, 2001, Vols. Nov;13(6):420-5.
19. *Breast cancer in young women: poor survival despite intensive treatment. .* **Fredholm H, Eaker S, Frisell J, Holmberg L, Fredriksson I, Lindman.** s.l. : H PLoS One, 2009, Vol. 4(11):e7695.
20. *Breast cancer epidemic in the early twenty-first century: evaluation of risk factors, cumulative questionnaires and recommendations for preventive measures.* **Golubnitschaja O, Debald M, Yeghiazaryan K, Kuhn W, Pešta M, Costigliola V, Grech G.** s.l. : Tumour Biol., 2016 , Vols. Oct;37(10):12941-12957. .
21. *Familial breast cancer: characteristics and outcome of BRCA 1-2 positive and negative cases.* **Veronesi A, de Giacomo C, Magri MD, Lombardi D, Zanetti M, Scuderi C, et al.** s.l. : BMC Cancer., 2005 , Vol. Jul 4;5:70.
22. *Adjusting the estimated proportion of breast cancer cases associated with BRCA1 and BRCA2 mutations: public health implications.* **McClain MR, Palomaki GE, Nathanson KL, Haddow JE.** s.l. : Genet Med, 2005, Vols. Jan;7(1):28-3.
23. *Women at high risk of breast cancer: Molecular characteristics, clinical presentation and management.* **Kleibl Z, Kristensen VN.** s.l. : Breast, 2016, Vols. Aug;28:136-44.
24. *Clinicopathologic characteristics of breast cancer in BRCA-carriers and non-carriers in women 35 years of age or less.* **Bayraktar S, Amendola L, Gutierrez-Barrera AM, Hashmi SS, Amos C, Gambello M, et al.** s.l. : Breast, 2014, Vols. Dec;23(6):770-4.

25. *Declining incidence of contralateral breast cancer in the United States from 1975 to 2006.* **Nichols HB, Berrington de González A, Lacey JV Jr, Rosenberg PS, Anderson WF.** s.l. : J Clin Oncol., 2011, Vols. Apr 20;29(12):1564-9.
26. *Contralateral breast cancer: incidence according to ductal or lobular phenotype of the primary.* **Langlands F, White J, Kearins O3, Cheung S, Burns R, Horgan K, Sharma N, et al.** s.l. : Clin Radiol., 2016 , Vols. Feb;71(2):159-63.
27. *Risk factors for breast cancer for women aged 40 to 49 years: a systematic review and meta-analysis.* . **Nelson HD, Zakher B, Cantor A, Fu R, Griffin J, O'Meara ES, et al.** s.l. : Ann Intern Med. , 2012, Vols. May 1;156(9):635-48. .
28. *Breast implant-associated anaplastic large cell lymphoma: review of a distinct clinicopathologic entity.* **Xu J, Wei S.** s.l. : Arch Pathol Lab Med., 2014, Vols. Jun;138(6):842-6.
29. *A new hypothesis for the cancer mechanism.* **Meng X, Zhong J, Liu S, Murray M, Gonzalez-Angulo AM.** s.l. : Cancer Metastasis Rev, 2012, Vols. 31(1–2):247–68.
30. *Projecting individualized probabilities of developing breast cancer for white females who are being examined annually.* **Gail MH, Brinton LA, Byar DP, Corle DK, Green SB, Schairer C, Mulvihill JJ.** s.l. : J Natl Cancer Inst., 1989, Vol. 81(24):1879.
31. *Clinical and pathologic features of ductal carcinoma in situ associated with the presence of flat epithelial atypia: an analysis of 543 patients.* **Collins LC, Achacoso NA, Nekhlyudov L, Fletcher SW, Haque R, Quesenberry CP, et al.** s.l. : Mod Pathol., 2007, Vol. 20(11):11.
32. *Breast cancer risk after diagnosis by screening mammography of nonproliferative or proliferative benign breast disease: a study from a population-based screening program.* **Castells X, Domingo L, Corominas JM, Torá-Rocamora I, Quintana MJ, Baré M, et al.** s.l. : Breast Cancer Res Treat, 2015 . , Vols. Jan;149(1):237-44.
33. *Diagnosis and management of benign, atypical, and indeterminate breast lesions detected on core needle biopsy..* . **Neal L, Sandhu NP, Hieken TJ, Glazebrook KN, Mac Bride MB, Dilaveri CA, et al.** s.l. : Mayo Clin Proc, 2014 , Vols. Apr;89(4):536-47. .
34. *Breast density and parenchymal patterns as markers of breast cancer risk: a meta-analysis.* **McCormack VA, dos Santos Silva I.** s.l. : Cancer Epidemiol Biomarkers Prev., 2006, Vol. 15(6):1159.
35. *Differences in management of older women influence breast cancer survival: results from a population-based database in Sweden.* **Eaker S, Dickman PW, Bergkvist L, Holmberg L, Uppsala/Orebro Breast Cancer Group.** s.l. : PLoS Med. , 2006, Vol. Mar;3(3):e2.
36. *Models of breast cancer show that risk is set by events of early life: prevention efforts must shift focus.* . **Colditz GA, Frazier AL.** s.l. : Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. , 1995, Vols. Jul-Aug;4(5):567-71.

37. *Longer therapy, iatrogenic amenorrhea, and survival in early breast cancer.* **Swain SM, Jeong JH, Geyer CE Jr, Costantino JP, Pajon ER, Fehrenbacher L, et al.** s.l. : N Engl J Med., 2010, Vol. 362(22):2053.
38. *Association between breast cancer laterality and tumor location, United States, 1994-1998.* . **Perkins CI, Hotes J, Kohler BA, Howe HL.** s.l. : Cancer Causes Control. , 2004 , Vols. Sep;15(7):637-45.
39. *Lower incidence but more aggressive behavior of right sided breast cancer in Pakistani women: does right deserve more respect?* . **Fatima N, Zaman MU, Maqbool A, Khan SH, Riaz N.** s.l. : Asian Pac J Cancer Prev., 2013, Vols. 14(1):43-5.
40. *Primary tumor location impacts breast cancer survival.* **Sohn VY, Arthurs ZM, Sebesta JA, Brown TA.** s.l. : Am J Surg., 2008, Vols. May;195(5):641-4.
41. *Medial tumor localization in breast cancer an unappreciated risk factor?.* **Bräutigam E, Track C, Seewald DH, Feichtinger J, Spiegl K, Hammer J.** s.l. : Strahlenther Onkol., 2009, Vols. Oct;185(10):663-8.
42. *Palpable breast cancers are inherently different from nonpalpable breast cancers .* **Skinner KA, Silberman H, Sposto R, Silverstein MJ.** s.l. : Ann Surg Oncol, 2001, Vols. 8:705–10.
43. *Bilateral breast cancer, synchronous and metachronous; differences and outcome.* **Jobsen JJ, van der Palen J, Ong F, Riemersma S, Struikmans H.** s.l. : Breast Cancer Res Treat. , 2015 , Vols. Sep;153(2):277-83. .
44. *Carcinoma bilateral de mama. Factores de riesgo del cáncer metacrónico.* **Morillo M, Cepeda M, López E, Carrasco S.** s.l. : Rev. senologia y patol. mam,, 1995, Vols. 8,3 (113-119).
45. *Systematic review: comparative effectiveness of core-needle and open surgical biopsy to diagnose breast lesions.* **Bruening W, Fontanarosa J, Tipton K, Treadwell JR, Lauenders J, Schoelles K.** s.l. : Ann Intern Med, 2010, Vols. 152(4):238-246.
46. *Comparative cost-effectiveness of fine needle aspiration biopsy versus image-guided biopsy, and open surgical biopsy in the evaluation of breast cancer in the era of Affordable Care Act: a changing landscape.* **Masood S, Rosa M, Kraemer DF, Smotherman C, Mohammadi A.** s.l. : Diagn Cytopathol., 2015, Vols. Aug;43(8):605-12.
47. *Multicentric and multifocal versus unifocal breast cancer: is the tumor-node-metastasis classification justified?* **Weissenbacher TM, Zschage M, Janni W, Jeschke U, Dimpfl T, Mayr D, et al.** s.l. : Breast Cancer Res Treat., 2010 , Vols. Jul;122(1):27-34.
48. *Multifocal and multicentric breast cancer is associated with increased local recurrence regardless of surgery type.* **Shaikh T, Tam TY, Li T, Hayes SB, Goldstein L, Bleicher R, et al.** s.l. : Breast J., 2015, Vols. Mar-Apr;21(2):121-6.
49. *MR imaging of the breast for the detection, diagnosis, and staging of breast cancer.* **Orel SG, Schnall MD.** s.l. : Radiology., 2001 , Vols. Jul;220(1):13-30.

50. . *Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases.* . **Carter CL, Allen C, Henson DE.** s.l. : Cancer, 1989, Vols. Jan 1;63(1):181-7.
51. *A prospective, multicenter validation study of a prognostic index composed of S-phase fraction, progesterone receptor status, and tumour size predicts survival in node-negative breast cancer patients: NNBC, the node-negative breast cancer trial.* **Klintman M, Nilsson F, Bendahl PO, Fernö M, Liljegren G, Emdin S, et al.** s.l. : Ann Oncol. , 2013. , Vols. Sep;24(9):2284-91 .
52. *Multicentric and multifocal versus unifocal breast cancer: is the tumor-node-metastasis classification justified? .* **Weissenbacher TM, Zschage M, Janni W, Jeschke U, Dimpfl T, Mayr D, et al.** s.l. : Breast Cancer Res Treat. , 2010. , Vols. Jul;122(1):27-34.
53. *Effect of multifocality and multicentricity on outcome in early stage breast cancer: a systematic review and meta-analysis.* **Vera-Badillo FE, Napoleone M, Ocana A, Templeton AJ, Seruga B, Al-Mubarak M, et al.** s.l. : Breast Cancer Res Treat, 2014 , Vols. Jul;146(2):235-44. .
54. *A Brief Overview of the WHO Classification of Breast Tumors, 4th Edition, Focusing on Issues and Updates from the 3rd Edition.* **Sinn HP, Kreipe H.** s.l. : Breast Care (Basel). , 2013 , Vols. May;8(2):149-54.
55. *Molecular and morphologic distinctions between infiltrating ductal and lobular carcinoma of the breast.* . **Yoder BJ, Wilkinson EJ, Massoll NA.** s.l. : Breast J., 2007 , Vols. Mar-Apr;13(2):172-9.
56. *Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer.* **Li CI, Uribe DJ, Daling JR.** s.l. : Br J Cancer., 2005 , Vols. Oct 31;93(9):1046-52.
57. *Risk factors for ductal, lobular, and mixed ductal-lobular breast cancer in a screening population.* . **Phipps AI, Li CI, Kerlikowske K, Barlow WE, Buist DS.** s.l. : Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. , 2010 , Vols. Jun;19(6):1643-54.
58. *Relationship between established breast cancer risk factors and risk of seven different histologic types of invasive breast cancer.* **Li CI, Daling JR, Malone KE, Bernstein L, Marchbanks PA, Liff JM, et al.** s.l. : Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2006 , Vols. May;15(5):946-54.
59. *Ductal carcinoma in situ of the breast: the importance of morphologic and molecular interactions.* . **Mardekian SK, Bombonati A, Palazzo JP.** s.l. : Hum Pathol. , 2016 , Vols. Mar;49:114-23.
60. *Ductal Carcinoma in situ of the breast.* **Grases P J, Tresserra F, Fábregas R.** s.l. : Prog Obstet Ginecol, 1999, Vols. 42:201-15.
61. *The influence of margin width on local control of ductal carcinoma in situ of the breast.* . **Silverstein MJ, Lagios MD, Groshen S, Waisman JR, Lewinsky BS, Martino S, et al.** s.l. : N Engl J Med, 1999, Vols. May 13;340(19):1455-61.

62. *Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up.* . **Elston CW, Ellis IO.** s.l. : Histopathology. , 1991 , Vols. Nov;19(5):403-10.
63. *The distance between breast cancer and the skin is associated with axillary nodal metastasis.* **Eom YH, Kim EJ, Chae BJ, Song BJ, Jung SS.** s.l. : J Surg Oncol, 2015 ., Vols. Jun;111(7):824-8.
64. *The distance between breast cancer and the skin is associated with axillary nodal metastasis.* . **Eom YH, Kim EJ, Chae BJ, Song BJ, Jung SS.** s.l. : J Surg Oncol. , 2015 , Vols. Jun;111(7):824-8. .
65. *Distance of breast cancer from the skin and nipple impacts axillary nodal metastases.* . **Ansari B, Morton MJ, Adamczyk DL, Jones KN, Brodt JK, Degnim AC, et al.** s.l. : Ann Surg Oncol., 2011, Vols. Oct;18(11):3174-80. .
66. *Issues relating to lymphovascular invasion in breast carcinoma.* . **Hoda SA, Hoda RS, Merlin S, Shamonki J, Rivera M.** s.l. : Adv Anat Pathol., 2006 , Vols. Nov;13(6):308-15.
67. *Population-based study of peritumoral lymphovascular invasion and outcome among patients with operable breast cancer.* **Ejlertsen B, Jensen MB, Rank F, Rasmussen BB, Christiansen P, Kroman N, et al.** s.l. : J Natl Cancer Inst. , 2009, Vols. May 20;101(10):729-35.
68. *Breast cancer during follow-up and progression - A population based cohort on new cancers and changed biology.* **Karlsson E, Appelgren J, Solterbeck A, Bergenheim M, Alvariza V, Bergh J.** s.l. : Eur J Cancer. , 2004, Vols. Nov;50(17):2916-24.
69. *Outcome prediction for estrogen receptor-positive breast cancer based on postneoadjuvant endocrine therapy tumor characteristics.* **Ellis MJ, Tao Y, Luo J, A'Hern R, Evans DB, Bhatnagar AS, et al.** s.l. : J Natl Cancer Inst., 2008, Vols. Oct 1;100(19):1380-8.
70. *Breast cancer subtypes based on ER/PR and Her2 expression: comparison of clinicopathologic features and survival.* . **Onitilo AA, Engel JM, Greenlee RT, Mukesh BN.** s.l. : Clin Med Res., 2009, Vols. Jun;7(1-2):4-13.
71. *Progesterone receptor status significantly improves outcome prediction over estrogen receptor status alone for adjuvant endocrine therapy in two large breast cancer databases.* **Bardou VJ, Arpino G, Elledge RM, Osborne CK, Clark GM.** s.l. : J Clin Oncol., 2003, Vols. May 15;21(10):1973-9.
72. *HER2-directed therapy: current treatment options for HER2-positive breast cancer.* . **Ahmed S, Sami A, Xiang J.** s.l. : Breast Cancer. , 2015 , Vols. Mar;22(2):101-1.
73. *HER2 and response to paclitaxel in node positive breast cancer.* . **Hayes DF, Thor AD, Dressler LG, Weaver D, Edgerton SCowan D, Broadwater G, Goldstein LJ, Martino S, Ingle JN.** 2007, New England Journal of Medicine, págs. 1496–1506.
74. *Comparison of HER2 status by fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry to predict benefit from dose escalation of adjuvant doxorubicin based therapy in node-positive*

breast cancer patients. **Dressler LG, Berry DA, Broadwater G, Cowan D, Cox K, Griffin S, Miller A, Tse J, Novotny D, Persons DL et al.** 2005, *Journal of Clinical Oncology* , págs. 4287–4297.

75. *Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients.* . **de Azambuja E, Cardoso F, de Castro G Jr, Colozza M, Mano MS, Durbecq V, Sotiriou C, Larsimont D, Piccart-Gebhart MJ & Paesmans.** 2007, *British Journal of Cancer* , págs. 1504–1513.

76. *Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer.* **Urruticoechea A, Smith IE, Dowsett M.** s.l. : *Clin Oncol.* , 2005 , Vols. Oct 1;23(28):7212-20.

77. *An international Ki67 reproducibility study. International Ki67 in Breast Cancer Working Group of the Breast International Group and North American Breast Cancer Group.* **Polley MY, Leung SC, McShane LM, Gao D, Hugh JC, Mastropasqua MG, et al.** s.l. : *Natl Cancer Inst.*, 2013, Vols. Dec 18;105(24):1897-906.

78. *Prognostic and predictive value of p53 and p21 in breast cancer.* **Elledge RM, Allred DC.** s.l. : *Breast Cancer Res Treat*, 1998, Vols. 52:79-89.

79. *Molecular portraits of human breast tumours.* **Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al.** s.l. : *Nature.* , 2000, Vols. Aug 17;406(6797):747-52.

80. *Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications.* **Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, et al.** s.l. : *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, Vols. Sep 11; 98(19):10869-74.

81. *Distinct molecular mechanisms underlying clinically relevant subtypes of breast cancer: gene expression analyses across three different platforms.* **Sørlie T, Wang Y, Xiao C, Johnsen H, Naume B, Samaha RR, et al.** s.l. : *BMC Genomics*, 2006, Vol. May 26;7:127.

82. *Wirapati P, Sotiriou C, Kunkel S, Farmer P, Pradervand S, Haibe-Kains B, et al. signatures., Meta-analysis of gene expression profiles in breast cancer: toward a unified understanding of breast cancer subtyping and prognosis.* s.l. : *Breast Cancer Res*, 2008, Vol. 10(4):R65. .

83. *Clinical utility of gene-expression profiling in women with early breast cancer: an overview of systematic reviews.* . **Marrone M, Stewart A, Dotson WD.** s.l. : *Genet Med.*, 2015 , Vols. Jul;17(7):519-32. .

84. *Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013.* **Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thürlimann B, et al.** s.l. : *Ann Oncol.* , 2013 , Vols. Sep;24(9):2206-23.

85. *Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up.* **Senkus E, Kyriakides S, Ohno S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Rutgers E, et al.** s.l. : *Ann Oncol.* , 2015 , Vols. Sep;26 Suppl 5:v8-30.

86. *Lymphatic mapping and sentinel node biopsy in the patient with breast cancer.* **Albertini JJ, Lyman GH, Cox C, et al.** s.l. : *JAMA*, 1996, Vols. 276:1818–1822.

87. *Sentinel-node biopsy to avoid axillary dissection in breast cancer with clinically negative lymph-nodes.* . **Veronesi U, Paganelli G, Galimberti V, Viale G, Zurrida S, Bedoni M, et al.** s.l. : Lancet., 1997 , Vols. Jun 28;349(9069):1864-7.
88. *Management and survival of female breast cancer: results of a national survey by the American College of Surgeons.* **Nemoto T, Vana J, Bedwani RN, Baker HW, McGregor FH, Murphy GP.** s.l. : Cancer, 1980, Vols. 45:2917–2924.
89. *Sentinel lymph-node resection compared with conventional axillary-lymph-node dissection in clinically node-negative patients with breast cancer: overall survival findings from the NSABP B-32 randomised phase 3 trial.* **Krag DN, Anderson SJ, Julian TB, Brown AM, Harlow SP, Costantino JP, et al.** s.l. : Lancet Oncol , 2010, Vols. 11:927–33.
90. *Findings from NSABP Protocol B-04: comparison of radical mastectomy with alternative treatments. II. The clinical and biologic significance of medial-central breast cancers.* . **Fisher B, Wolmark N, Redmond C, Deutsch M, Fisher E.** s.l. : Cancer, 1981, Vols. 48:1863–1872.
91. *Level I and II axillary dissection in the treatment of early-stage breast cancer. An analysis of 259 consecutive patients.* . **Siegel BM, Mayzel KA, Love SM.** s.l. : Arch Surg., 1990, Vols. 125:1144–1147.
92. *An approach for the treatment of penile cancer.* **RM, Cabanas.** s.l. : Cancer, 1977, Vols. 39: 456-466.
93. *Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma.* **Morton DL, Wen DR, Wong JH, Economou JS, Cagle LA, Storm FK, Foshag LJ, Cochran AJ.** s.l. : Arch Surg, 1992, Vols. Apr;127(4):392-9.
94. *Surgical resection and radiolocalization of the sentinel node in breast cancer using a gamma probe.* **Krag DN, Weaver OJ, Alex JC, Fairbank JT.** . s.l. : Surg Oncol. , 1993 , Vols. Dec;2(6):335-9.
95. *Lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for breast cancer.* **Giuliano AE, Kirgan DM, Guenther JM, Morton DL.** s.l. : Ann Surg., 1994 , Vols. Sep; 220(3):391-8.
96. *American Society of Clinical Oncology guideline recommendations for sentinel lymph node biopsy in early-stage breast cancer.* **American Society of Clinical Oncology: Lyman GH, Giuliano AE, Somerfield MR, Benson AB 3rd, Bodurka DC, Burstein HJ, et al.** s.l. : Oct 20;23(30):7703-20, 2005, Vol. J Clin Oncol. .
97. *Lymphatic mapping and sentinel lymph node biopsy in early-stage breast carcinoma: a metaanalysis.* **Kim T, Giuliano AE, Lyman GH.** s.l. : Cancer , 2006, Vols. Jan 1;106(1):4-16. .
98. *Post-operative arm morbidity and quality of life. Results of the ALMANAC randomised trial comparing sentinel node biopsy with standard axillary treatment in the management of patients with early breast cancer.* **Fleissig A, Fallowfield LJ, Langridge CI, Johnson L, Newcombe RG, Dixon JM, et al.** s.l. : Breast Cancer Res Treat., 2006, Vols. Feb;95(3):279-93.

99. *American Society of Clinical Oncology guideline recommendations for sentinel lymph node biopsy in early-stage breast cancer.* L. **yman GH, Giuliano AE, Somerfield MR, Benson AB 3rd, Bodurka DC, Burstein HJ, et al.** s.l. : J Clin Onco, 2005, Vols. Oct 20;23(30):7703-20.
100. *Sentinel lymph node biopsy compared with axillary lymph node dissection in early breast cancer: a meta-analysis.* **Wang Z, Wu LC, Chen JQ.** s.l. : Breast Cancer Res Treat., 2011 , Vols. Oct;129(3):675-89.
101. *Sentinel lymph node biopsy results in less postoperative morbidity compared with axillary lymph node dissection for breast cancer.* **Burak WE, Hollenbeck ST, Zervos EE, Hock KL, Kemp LC, Young DC.** s.l. : Am J Surg., 2002 , Vols. Jan;183(1):23-7.
102. *Long-term morbidity of sentinel node biopsy versus complete axillary dissection for unilateral breast cancer.* **Crane-Okada R, Wascher RA, Elashoff D, Giuliano AE.** s.l. : Ann Surg Oncol., 2008, Vols. Jul;15(7):1996-2005.
103. *Consenso sobre la biopsia selectiva del ganglio centinela en el cáncer de mama. Revisión 2013 de la Sociedad Española de Senología y Patología Mamaria.* **Bernet L, Piñero A, Vidal-Sicart S, Peg V, Giménez J, Algara M, et al.** s.l. : RevSenolPatolMamar., 2014, Vols. 27(1):43-53.
104. *Sentinel lymph node micrometastasis in human breast cancer: an update.* . **Salhab M, Patani N, Mokbel K.** s.l. : Surg Oncol., 2011 , Vols. Dec;20(4):e195-206. .
105. *Micrometastases or isolated tumor cells and the outcome of breast cancer.* **de Boer M, van Deurzen CHM, van Dijck J, Borm GF, van Diest PJ, Adang EMM, et al.** s.l. : N Engl J Med , 2009, Vols. 361:653–63.
106. *Current status of sentinel lymph-node biopsy in patients with breast cancer.* . **Cheng G, Kurita S, Torigian DA, Alavi A.** s.l. : Eur J Nucl Med Mol Imaging. , 2011, Vols. Mar;38(3):562-75.
107. *Radioguided sentinel lymph node biopsy in breast cancer surgery.* . **Mariani G, Moresco L, Viale G, Villa G, Bagnasco M, Canavese G, et al.** s.l. : J Nucl Med. , 2001 , Vols. Aug;42(8):1198-215.
108. *Isosulfan blue dye reactions during sentinel lymph node mapping for breast cancer.* **Montgomery LL, Thorne AC, Van Zee KJ, Fey J, Heerdt AS, Gemignani M, et al.** s.l. : Anesth Analg. , 2002, Vols. Aug;95(2):385-8 .
109. *Prospective multicentric randomized study comparing periareolar and peritumoral injection of radiotracer and blue dye for the detection of sentinel lymph node in breast sparing procedures: FRANSENODE trial.* **Rodier JF, Velten M, Wilt M, Martel P, Ferron G, Vaini-Elies V, et al.** s.l. : J Clin Oncol., 2007 , Vols. Aug 20;25(24):3664-9.
110. *The EANM and SNMMI practice guideline for lymphoscintigraphy and sentinel node localization in breast cancer.* **Giammarile F, Alazraki N, Aarsvold JN, Audisio RA, Glass E, Grant SF, et al.** s.l. : Eur J Nucl Med Mol Imaging., 2013 , Vols. Dec;40(12):1932-47.

111. *Clinical relevance of novel imaging technologies for sentinel lymph node identification and staging.* **Cousins A, Thompson SK, Wedding AB, Thierry B.** s.l. : Biotechnol Adv. , 2014 , Vols. Mar-Apr;32(2):269-79. .
112. *Preoperative lymphoscintigraphy during lymphatic mapping for breast cancer: improved sentinel node imaging using subareolar injection of technetium 99m sulfur colloid.* **Kern KA, Rosenberg RJ.** s.l. : J Am Coll Surg., 2000, Vols. Nov;191(5):479-89.
113. *Contribution of SPECT/CT imaging to radioguided sentinel lymph node biopsy in breast cancer, melanoma, and other solid cancers: from "open and see" to "see and open".* **Valdés Olmos RA, Rietbergen DD, Vidal-Sicart S, Manca G, Giammarile F, Mariani G. Q.** s.l. : J Nucl Med Mol Imaging. , 2014, Vols. Jun;58(2):127-39. .
114. *Comparative evaluation of an extensive histopathologic examination and a real-time reverse-transcription-polymerase chain reaction assay for mammaglobin and cytokeratin 19 on axillary sentinel lymph nodes of breast carcinoma patients.* **Viale G, Dell'Orto P, Biasi MO, Stufano V, De Brito Lima LN, Paganelli G, et al.** : Ann Surg, 2008, Vols. Jan;247(1):136-42.
115. *A prospective study comparing touch imprint cytology, frozen section analysis, and rapid cytokeratin immunostain for intraoperative evaluation of axillary sentinel lymph nodes in breast cancer.* **Krishnamurthy S, Meric-Bernstam F, Lucci A, Hwang RF, Kuerer HM, Babiera G, et al.** s.l. : Cancer, 2009, Vols. Apr 1;115(7):1555-62.
116. *Discrepancies in current practice of pathological evaluation of sentinel lymph nodes in breast cancer. Results of a questionnaire based survey by the European Working Group for Breast Screening Pathology.* **Cserni G, Amendoeira I, Apostolikas N, Bellocq JP, Bianchi S, Boecker W, et al.** s.l. : J Clin Pathol. , 2004 , Vols. Jul;57(7):695-701.
117. *Discordance of intraoperative frozen section analysis with definitive histology of sentinel lymph nodes in breast cancer surgery: complementary axillary lymph node dissection is irrelevant for subsequent systemic therapy.* **Geertsema D, Gobardhan PD, Madsen EV, Albrechts M, van Gorp J, de Hooge P, van Dalen T.** s.l. : Ann Surg Oncol. , 2010, Vols. Oct;17(10):2690-5.
118. *Meta-analysis of sentinel node imprint cytology in breast cancer.* . **Tew K, Irwig L, Matthews A, Crowe P, Macaskill P.** s.l. : Br J Surg., 2005, Vols. Sep;92(9):1068-80.
119. *Intraoperative evaluation of axillary sentinel lymph nodes using touch imprint cytology and immunohistochemistry. Part II. Results.* . **Salem AA, Douglas-Jones AG, Sweetland HM, Mansel RE.** s.l. : Eur J Surg Oncol. , 2006, Vols. Jun;32(5):484-7.
120. *Cytokeratin staining for intraoperative evaluation of sentinel lymph nodes in patients with invasive lobular carcinoma.* **Weinberg ES, Dickson D, White L, Ahmad N, Patel J, Hakam A, et al.** s.l. : Am J Surg., 2004 , Vols. Oct;188(4):419-22.
121. *Molecular detection of breast cancer metastasis in sentinel lymph nodes by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR): identifying, evaluating and establishing*

multi-marker panels. **Wallwiener CW, Wallwiener M, Kurth RR, Röhm C, Neubauer H, Banys MJ, et al.** s.l. : Breast Cancer Res Treat., 2011 , Vols. Dec;130(3):833-44.

122. *Cytokeratin-19 and mammaglobin gene expression in circulating tumor cells from metastatic breast cancer patients enrolled in North Central Cancer Treatment Group trials, N0234/336/436/437.* **Reinholz MM, Kitzmann KA, Tenner K, Hillman D, Dueck AC, Hobday TJ, et al.** s.l. : Clin Cancer Res., 2011 , Vols. Nov 15;17(22):7183-93.

123. *Utility of the GeneSearch breast lymph node assay for the rapid evaluation of sentinel lymph nodes in breast cancer.* **Funasako Y, Uenosono Y, Hirata M, Arigami T, Yanagita S, Arima H, et al.** s.l. : Cancer., 2010 , Vols. Oct 1;116(19):4450-5. .

124. *One-step nucleic acid amplification for intraoperative detection of lymph node metastasis in breast cancer patients. .* **Tsujimoto M, Nakabayashi K, Yoshidome K, Kaneko T, Iwase T, Akiyama F, et al.** s.l. : Clin Cancer Res, 2007, Vols. 13(16):4807–4816.

125. *One-step nucleic acid amplification (OSNA) for intraoperative evaluation of sentinel lymph node status in breast cancer: a comparative study between CK19 protein expression and CK19 mRNA level in primary tumors and lymph node metastasis. .* **Pegolo E, Puppini C, Gerometta A, Damante G, Puglisi F, Di Loreto C.** s.l. : Virchows Arch., 2013 , Vols. Jul;463(1):7-15. .

126. *Importance of assessing CK19 immunostaining in core biopsies in patients subjected to sentinel node study by OSNA. .* **Vilardell F, Novell A, Martin J, Santacana M, Velasco A, Díez-Castro MJ, et al.** s.l. : Virchows Arch. , 2012, Vols. Jun;460(6):569-75.

127. *Intraoperative molecular assay for sentinel lymph node metastases in early stage breast cancer: a comparative analysis between one-step nucleic acid amplification whole node assay and routine frozen section histology.* **Osako T, Iwase T, Kimura K, Yamashita K, Horii R, Yanagisawa A, et al.** s.l. : Cancer., 2011 , Vols. Oct 1;117(19):4365-74.

128. *Intra-operative rapid diagnostic method based on CK19 mRNA expression for the detection of lymph node metastases in breast cancer.* **Visser M, Jiwa M, Horstman A, Brink AA, Pol RP, van Diest P, et al.** s.l. : Int J Cancer., 2008, Vols. Jun 1;122(11):2562-7.

129. *Reliability of whole sentinel lymph node analysis by one-step nucleic acid amplification for intraoperative diagnosis of breast cancer metastases.* **Castellano I, Macrì L, Deambrogio C, Balmativola D, Bussone R, Ala A, Coluccia C, et al.** s.l. : Ann Surg. , 2012, Vols. Feb;255(2):334-42.

130. *Diagnosis of the sentinel lymph node in breast cancer: a reproducible molecular method: a multicentric Spanish study..* **Bernet L, Cano R, Martinez M, Dueñas B, Matias-Guiu X, Morell L, Palacios J, et al.** s.l. : Histopathology. , 2011, Vols. May;58(6):863-9.

131. *Diagnostic performance of one-step nucleic acid amplification for intraoperative sentinel node metastasis detection in breast cancer patients.* **Le Frère-Belda MA, Bats AS, Gillaizeau F, Poulet B, Clough KB, Nos C, et al.** s.l. : Int J Cancer., 2012, Vols. May 15;130(10):2377-86.

132. *The real-time intra-operative evaluation of sentinel lymph nodes in breast cancer patients using One Step Nucleic Acid Amplification (OSNA) and implications for clinical decision-making.*

Chaudhry A, Williams S, Cook J, Jenkins M, Sohail M, Calder C, et al. s.l. : Eur J Surg Oncol. , 2014 , Vols. Feb;40(2):150-7. .

133. *Utility of one-step nucleic acid amplification (OSNA) assay in detecting breast cancer metastases of sentinel lymph nodes in a Chinese population.* **Li D, Xu X, Chen J, Chen J, Yang B, Yang W, et al.** s.l. : Breast Cancer. , 2015, Vols. Mar;22(2):135-40.

134. *A differential intra-operative molecular biological test for the detection of sentinel lymph node metastases in breast carcinoma. An extended experience from the first U.K. centre routinely offering the service in clinical practice.* **Babar M, Madani R, Thwaites L, Jackson PA, Devalia HL, Chakravorty A, et al.** s.l. : Eur J Surg Oncol. , 2014 , Vols. Mar;40(3):282-8.

135. *Advantages of one step nucleic acid amplification (OSNA) whole node assay in sentinel lymph node (SLN) analysis in breast cancer.* . **Santaballa A, De La Cueva H, Salvador C, García-Martínez AM, Guarín MJ, Lorente D, et al.** s.l. : Springerplus, 2013, Vol. Oct 17;2:542.

136. *Diagn Mol Pathol.* 2012 Jun;21(2):69-76. *Comparison of molecular analysis and histopathology for axillary lymph node staging in primary breast cancer: results of the B-CLOSER-I study.* **Vegué LB, Rojo F, Hardisson D, Iturriagagoitia AC, Panadés MJ, Velasco A, et al** **y Investigators., B-CLOSER-I.** s.l. : Diagn Mol Pathol., 2012, Vols. Jun;21(2):69-76.

137. *Locoregional recurrence after sentinel lymph node dissection with or without axillary dissection in patients with sentinel lymph node metastases: the American College of Surgeons Oncology Group Z0011 randomized trial.* **Giuliano AE, McCall L, Beitsch P, Whitworth PW, Blumencranz P, Leitch AM, et al.** g. s.l. : Ann Sur, 2010, Vols. Sep;252(3):426-32.

138. *Omission of axillary lymph node dissection for clinically node negative early-stage breast cancer patients.* . **Kobayashi R, Shiraishi K, Iwase S, Ohtomo K, Nakagawa K.** s.l. : Breast Cancer. , 2015 , Vols. Nov;22(6):657-63.

139. *Positive axillary sentinel lymph node: is axillary dissection always necessary?* . **Galimberti V, Chifu C, Rodriguez Perez S, Veronesi P, Intra M, Botteri E, et al.** s.l. : Breast. , 2011, Vols. Oct;20 Suppl 3:S96-8.

140. *Locoregional Recurrence After Sentinel Lymph Node Dissection With or Without Axillary Dissection in Patients With Sentinel Lymph Node Metastases: Long-term Follow-up From the American College of Surgeons Oncology Group (Alliance) ACOSOG Z0011 .* **Giuliano AE, Ballman K, McCall L, Beitsch P, Whitworth PW, Blumencranz P, et al.** s.l. : Ann Surg, 2016, Vols. Sep;264(3):413-20.

141. *Detailed evaluation of one step nucleic acid (OSNA) molecular assay for intra-operative diagnosis of sentinel lymph node metastasis and prediction of non-sentinel nodal involvement: experience from a London teaching hospital.* **Banerjee SM, Michalopoulos NV, Williams NR, Davidson T, El Sheikh S, McDermott N, et al.** s.l. : Breast. , 2014, Vols. Aug;23(4):378-84. .

142. *Elaboration of a nomogram to predict non sentinel node status in breast cancer patients with positive sentinel node, intra-operatively assessed with one step nucleic acid amplification*

method. **Di Filippo F, Giannarelli D, Bouteille C, Bernet L, Cano R, Cunnick G, et al.** s.l. : J Exp Clin Cancer Res., 2015 , Vol. Nov 4;34:136.

143. *Sentinel node tumour burden quantified based on cytokeratin 19 mRNA copy number predicts non-sentinel node metastases in breast cancer: molecular whole-node analysis of all removed nodes.* **Osako T, Iwase T, Kimura K, Horii R, Akiyama F.** s.l. : Eur J Cancer., 2013, Vols. Apr;49(6):1187-95.

144. *Nomogram including the total tumoral load in the sentinel nodes assessed by one-step nucleic acid amplification as a new factor for predicting nonsentinel lymph node metastasis in breast cancer patients.* **Rubio IT, Espinosa-Bravo M, Rodrigo M, Amparo Viguri Diaz M, Hardisson D, et al.** s.l. : Breast Cancer Res Treat., 2014 , Vols. Sep;147(2):371-80.

145. *Predictors of axillary lymph node metastases in patients with T1 breast carcinoma.* . **Barth A, Craig PH, Silverstein MJ.** s.l. : Cancer, 1997 , Vols. May 15;79(10):1918-22.

146. *Doctor, what are my chances of having a positive sentinel node? A validated nomogram for risk estimation.* **Bevilacqua JL, Kattan MW, Fey JV, Cody HS, Borgen PI, Van Zee KJ.** s.l. : J Clin Oncol., 2007, Vols. Aug 20;25(24):3670-9.

147. *Frequency and predictors of axillary lymph node metastases in invasive breast cancer.* . **Chua B, Ung O, Taylor R, Boyages J.** s.l. : ANZ J Surg., 2001 , Vols. Dec;71(12):723-8.

148. *Predictors of axillary lymph node metastasis in breast cancer a systematic review.* . **Patani NR, Dwek MV, Douek M.** s.l. : Eur J Surg Oncol, 2007, Vol. May;33(4):409e19.

149. *Modelo predictivo multiparamétrico del estatus axilar en pacientes con cáncer de mama: carga tumoral total y perfil molecular. Estudio Multicéntrico.* . **Bernet L, García-Gómez JM, Cano R, Pinero A, Ramírez AK, Rodrigo M, et al.** s.l. : RevSenolPatolMamar, 2015, Vols. 28(3):96-104.

150. *Intraoperative molecular analysis of total tumor load in sentinel lymph node: a new predictor of axillary status in early breast cancer patients.* **Peg V, Espinosa-Bravo M, Vieites B, Vilardell F, Antúnez JR, de Salas MS, et al.** s.l. : Breast Cancer Res Treat, 2013 , Vols. May;139(1):87-93 .

151. *Tumoral load quantification of positive sentinel lymph nodes in breast cancer to predict more than two involved nodes.* . **Piñero-Madrona A, Ruiz-Merino G, Bernet L, Miguel-Martínez B, Vicente-García F, Viguri-Díaz MA, et al.** s.l. : Breast., 2014 , Vols. Dec;23(6):859-64.

152. *Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer working group.* **Dowsett M, Nielsen TO, A'Hern R, Bartlett J, Coombes RC, Cuzick J, et al. International Ki-67 in Breast Cancer Working Group.** s.l. : J Natl Cancer Inst, 2011 , Vols. Nov 16;103(22):1656-64.

153. *A new clinical cut-off of cytokeratin 19 mRNA copy number in sentinel lymph node better identifies patients eligible for axillary lymph node dissection in breast cancer.* **Deambrogio C,**

Castellano I, Paganotti A, Zorini EO, Corsi F, Bussone R, et al. s.l. : J Clin Pathol, 2014, Vols. Aug;67(8):702-6.

154. *Análisis de la incidencia, la supervivencia y la mortalidad según las principales localizaciones tumorales, 1985-2019: cáncer de mama.* **Izquierdo A, Gispert R, Saladie F, Espinàs J.A.** s.l. : Med Clin (Barc)., 2008, Vols. 131(Supl 1):50-52 .

155. *Prediction of non-sentinel lymph node metastasis in early breast cancer by assessing total tumoral load in the sentinel lymph node by molecular assay.* **Espinosa-Bravo M, Sansano I, Pérez-Hoyos S, Ramos M, Sancho M, Xercavins J, et al.** s.l. : Eur J Surg Oncol., 2013, Vols. Jul;39(7):766-73.

156. *Predictive factors associated with axillary lymph node metastases in T1a and T1b breast carcinomas: analysis in more than 900 patients.* . **Rivadeneira DE, Simmons RM, Christos PJ, Hanna K, Daly JM, Osborne MP.** s.l. : J Am Coll Surg. , 2000, Vols. Jul;191(1):1-6.

157. *Value of frozen section and primary tumor factors in determining sentinel lymph node spread in early breast carcinoma.* . **Jaka RC, Zaveri SS, Somashekhar SP, Sureshchandra, Parameswaran RV.** s.l. : Jan;1(1):27-36, 2010, Vol. Indian J Surg Oncol.

158. *Quantitation of sentinel node metastatic burden and Her-2/neu over-expression accurately predicts residual axillary nodal involvement and extranodal disease in breast cancer.* **Chae AW, Vandewalker KM, Li YJ, Beckett LA, Ramsamooj R, Bold RJ, Khatri VP.** s.l. : Eur J Surg Oncol., 2013 , Vols. Jun;39(6):627-33.

159. *Quantitative molecular analysis of sentinel lymph node may be predictive of axillary node status in breast cancer classified by molecular subtypes.* . **Buglioni S, Di Filippo F, Terrenato I, Casini B, Gallo E, Marandino F, Maini CL, et al.** s.l. : PLoS One, 2013, Vol. 8(3):e58823.

160. *Predicting the status of axillary sentinel lymph nodes in 4351 patients with invasive breast carcinoma treated in a single institution.* **Viale G, Zurrida S, Maiorano E, Mazzarol G, Pruneri G, Paganelli G, et al.** s.l. : Cancer, 2005, Vol. 103(3):492e500.

161. *Predictors of axillary lymph node metastases in early breast cancer and their applicability in clinical practice...* **Yoshihara E, Smeets A, Laenen A, Reynders A, Soens J, Van Ongeval C, et al.** s.l. : Breast, 2013, Vols. Jun;22(3):357-61.

162. *Intra-operative use of one-step nucleic acid amplification (OSNA) for detection of the tumor load of sentinel lymph nodes in breast cancer patients.* **Heilmann T, Mathiak M, Hofmann J, Mundhenke C, van Mackelenbergh M, Alkatout I, et al.** s.l. : J Cancer Res Clin Oncol., 2013, Vols. Oct;139(10):1649-55.

163. *Sentinel lymph node biopsy in breast cancer: predictors of axillary and non-sentinel lymph node involvement.* . **Postacı H, Zengel B, Yararbaş U, Uslu A, Eliyatkin N, Akpınar G, et al.** s.l. : Balkan Med J. , 2013 , Vols. Dec;30(4):415-21. .

164. *Do we know how many cancer patients have a family history of cancer?* **Andjelic-Dekic N, Tomasevic Z, Milosevic S, Kolarevic D, Jelic S.** s.l. : J BUON, 2010, Vols. Jan-Mar;15(1):127-30.

165. *Properties of Synchronous Versus Metachronous Bilateral Breast Carcinoma with Long Time Follow Up.* **Eliyatkin N, Zengel B, Yagci A, Comut E, Postaci H, Uslu A, et al.** s.l. : Asian Pac J Cancer Prev, 2015, Vols. 16(12):4921-6.
166. *Declining incidence of contralateral breast cancer in the United States from 1975 to 2006.* **Nichols HB, Berrington de González A, Lacey JV Jr, Rosenberg PS, Anderson WF.** s.l. : J Clin Oncol. , 2011 , Vols. Apr 20;29(12):1564-9.
167. *Using clinical factors and mammographic breast density to estimate breast cancer risk: development and validation of a new predictive model .* **Tice JA, Cummings SR, Smith-Bindman R, Ichikawa L, Barlow WE, Kerlikowske K.** s.l. : . Ann Intern Med., 2008, Vols. 148(5):337–347.
168. *Clinicopathologic features of breast cancers that develop in women with previous benign breast disease. .* **Visscher DW, Frost MH, Hartmann LC, Frank RD, Vierkant RA, McCullough AE, et al.** s.l. : Cancer., 2016, Vols. Feb 1;122(3):378-85.
169. *Risk factors for sentinel lymph node metastasis and validation study of the MSKCC nomogram in breast cancer patients. .* **Qiu PF, Liu JJ, Wang YS, Yang GR, Liu YB, Sun X, et al.** s.l. : Jpn J Clin Oncol. , 2012, Vols. Nov;42(11):1002-7.
170. *Prognostic value of breast cancer subtypes, Ki-67 proliferation index, age, and pathologic tumor characteristics on breast cancer survival in Caucasian women.* **Ferguson NL, Bell J, Heideel R, Lee S, Vanmeter S, Duncan L, et al.** s.l. : Breast J. , 2013, Vols. Jan-Feb;19(1):22-30.
171. *Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer.* **Li CI, Uribe DJ, Daling JR.** s.l. : Br J Cancer. , 2005, Vols. Oct 31;93(9):1046-52.
172. *Clinical and pathological factors predictive of lymph node status in women with screen-detected breast cancer.* **Gill PG, Luke CG, Roder DM.** s.l. : Breast., 2006 , Vols. Oct;15(5):640-8.
173. *Predictive value of pathological and immunohistochemical parameters for axillary lymph node metastasis in breast carcinoma. .* **Yenidunya S, Bayrak R, Haltas H.** s.l. : Diagn Pathol., 2011, Vol. Mar 13;6:18. .
174. *Whole sentinel lymph node analysis by a molecular assay predicts axillary node status in breast cancer.* **Ohi Y, Umekita Y, Sagara Y, Rai Y, Yotsumoto D, Matsukata A, et al.** s.l. : Br J Cancer., 2012, Vols. Oct 9;107(8):1239-43.
175. *dditional axillary metastases and stage migration in breast cancer patients with micrometastases or submicrometastases in sentinel lymph nodes.* **van Rijk MC, Peterse JL, Nieweg OE, Oldenburg HS, Rutgers EJ, Kroon BB. A.** s.l. : Cancer, 2006, Vol. Aug 1;107(3):467e71.
176. *Predictive factors of isolated tumor cells and micrometastases in axillary lymph nodes in breast cancer.* **Madsen EV, Elias SG, van Dalen T, van Oort PM, van Gorp J, Gobardhan PD, et al.** s.l. : Breast, 2013, Vols. Oct;22(5):748-52.

177. *Breast cancer metastasis burden in sentinel nodes analysed using one-step nucleic acid amplification predicts axillary nodal status.* **Milner TD, de Lusignan S, Jones S, Jackson PA, Langer GT, Kissin MW, et al.** s.l. : Breast. , 2015, Vols. Oct;24(5):568-75.
178. *Disruption of the expected positive correlation between breast tumor size and lymph node status in BRCA1-related breast carcinoma.* . **Foulkes WD, Metcalfe K, Hanna W, Lynch HT, Ghadirian P, Tung N, et al.** s.l. : Cancer., 2003 , Vols. Oct 15;98(8):1569-77.
179. *A prediction model for the presence of axillary lymph node involvement in women with invasive breast cancer: a focus on older women.* **Greer LT, Rosman M, Charles Mylander W, Liang W, Buras RR, Chagpar AB, et al.** s.l. : Breast J. , 2014 , Vols. Mar-Apr;20(2):147-53. .
180. *Basal breast cancer molecular subtype predicts for lower incidence of axillary lymph node metastases in primary breast cancer.* **Crabb SJ, Cheang MC, Leung S, Immonen T, Nielsen TO, Huntsman DD, et al.** s.l. : Clin Breast Cancer., 2008 , Vols. Jun;8(3):249-56.
181. *Impact of intrinsic subtype on predicting axillary lymph node metastasis in breast cancer.* **Sawaki M, Idota A, Ichikawa M, Gondo N, Horio A, Kondo N, et al.** s.l. : Oncol Lett, 2014, Vols. Oct;8(4):1707-1712. .
182. *Clinical application of the one-step nucleic acid amplification method to detect sentinel lymph node metastasis in breast cancer.* . **Sagara Y, Ohi Y, Matsukata A, Yotsumoto D, Baba S, Tamada S, et al.** s.l. : Breast Cancer., 2013, Vols. Apr;20(2):181-6. .
183. *Tumor size is an unreliable predictor of prognosis in basal-like breast cancers and does not correlate closely with lymph node status.* **Foulkes WD, Grainge MJ, Rakha EA, Green AR, Ellis IO.** s.l. : Breast Cancer Res Treat, 2009 , Vols. Sep;117(1):199-204.
184. *Breast screening prognostic factors and survival—results from the Swedish two-county study.* **Duffy SW, Tabar L, Fagerberg G, Gad A, Grontoft O, South MC.** s.l. : Br J Cancer, 1991, Vols. 64:1133–8.

Anexos

Anexo 1: Tabla Modelo Recogida de Datos

Variable	Codificación
NC	Número de caso
Id	Número de Paciente
Edad	Años
Menopausia	1= Premenopáusica 2= menopáusica
Cáncer de mama previo	0= no 1= si
Cirugía previa mama afecta	0= no 1= si
Patología benigna	0= no 1= si
AF cáncer de mama	0= no 1= si
Ca bilateral sincrónico	0= no 1= si
Mama izquierda o Derecha	0= izquierda 1= Derecha
Tipo lesión	0= no palpable 1= si palpable
Cuadrante	1= CSE/UCE 2= Retroareolar 3=otros
Tipo Foco	0= único 1= multifocal 2= multicéntrico
Nº lesiones radiológicas	
Tamaño Radiológico total	milímetros
ECOPAAF	0= no 1= si
Nº focos AP	
Tamaño histológico total	
Tamaño histológico Foco mayor	
Estadio pT	1= pT1mic 2= pT1a 3= pT1b 4=pT1c 5=pT2 6= pT3
Tipo histológico	1= ductal 2= lobulillar 3= otros
Componente intraductal	1= escaso o nulo 2= extenso
Grado histológico	1= tipo I 2= Tipo II 3= Tipo III
ILV	0= no 1= si
Infiltración de piel	0= no 1= si
Receptores Estrógeno	0= negativo 1= positivo
RE %	% de expresión
Receptores Progesterona	0= negativo 1= positivo
RP %	% de expresión
Ki67	% de expresión
HER2neu	0= negativo 1= positivo

Subtipo molecular	1=Luminal A 2=Luminal B her2 negativo 3=Luminal B her2 positivo 4=Her2 positivo 5=Basal Like
p53	0= negativo 1= positivo
Nº GC	número de ganglios centinela
OSNA GC 1	Número de copias de ARNm
OSNA GC 2	Número de copias de ARNm
OSNA GC 3	Número de copias de ARNm

Anexo 2: certificado de aprobación del comité de ética.

INFORME DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

D^a Almudena Castro Conde, Presidenta del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario La Paz

CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado la propuesta de la investigadora Mariana Panal Cusati del Servicio de Ginecología del Hospital Maternal del Hospital Universitario "La Paz" para que se realice el estudio titulado **'RELACIÓN DE LOS BIOMARCADORES DEL CÁNCER DE MAMA CON LA CARGA TUMORAL DEL GANGLIO CENTINELA CUANTIFICADO POR EL MÉTODO OSNA'**, código HULP: **PI-1776**,

y considera que:

- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.
- La capacidad del investigador y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.
- Es adecuado el procedimiento para obtener el consentimiento informado y no interfiere con el respeto a los postulados éticos.

Y que este Comité acepta que dicho estudio sea realizado por la investigadora Mariana Panal Cusati del Servicio de Ginecología del Hospital Maternal del Hospital Universitario "La Paz", como investigador principal.

Lo que firmo en Madrid a 3 de julio de 2014

Firmado: D^a Almudena Castro Conde

